

Biogenese des Rieske-Eisen-Schwefel-Proteins der Mitochondrien



Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilian-Universität München

vorgelegt von
Markus Ackermann

am
31. Juli 2012

Gutachter

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Soll (Botanik)
2. Gutachter: Prof. Dr. Barbara Conradt (Zell- u. Entwicklungsbiologie)
3. Gutachter: Prof. Dr. Ute Vothknecht (Botanik)
4. Gutachter: PD. Dr. Felix Felmy (Neurobiologie)
5. Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Jung (Mikrobiologie)
6. Gutachter: Prof. Dr. Angelika Böttger (Zell- u. Entwicklungsbiologie)

Sondergutachter: Prof. Dr. Dr. Walter Neupert

Tag des Rigorosums: 22. Oktober 2012

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne der derzeit gültigen Promotionsordnung der Ludwig-Maximilians-Universität München von Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Neupert betreut und von Herrn Prof. Dr. Jürgen Soll vor der Fakultät für Biologie verteten.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den 31. Juli 2012

.....
Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

0. Zusammenfassung.....	8
1. Einleitung.....	10
1.1 Das Rieske-Eisen-Schwefel-Protein	10
1.1.1 Topologie des Rieske-Eisen-Schwefel-Proteins	10
1.1.2 Rieske-Proteine in Elektronen-übertragenden Komplexen	11
1.2 Posttranslationale Modifizierungen von Rip1	12
1.3 Die Biogenese von Rip1: Stand der Forschung.....	13
1.3.1 Das „ <i>Twin arginine translocation</i> “(TAT)-System	13
1.3.2 Die Rolle von Bcs1	14
1.4 Topologie und strukturelle Elemente von Bcs1	16
1.5 Funktionsweise von AAA-Proteinen	18
2. Material und Methoden	21
2.1 Molekularbiologische Methoden	21
2.1.1 DNA-Präparation aus <i>E. coli</i>	21
2.1.2 DNA-Präparation aus Hefe	21
2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	22
2.1.4 Restriktionsverdau von DNA	22
2.1.5 Agarosegelelektrophorese	23
2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten	23
2.1.7 Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen.....	23
2.1.8 Transformation von <i>E. coli</i>	24
2.1.9 Klonierung von verwendeten Konstrukten	24
2.1.9.1 Klonierung von pRS426-Rip1-Varianten	26
2.1.9.2 Klonierung von pRS426-His-Rip1.....	27
2.1.9.3 Klonierung von pYep51vk-His-Bcs1(E319Q)	28
2.1.9.4 Klonierung von pGEM4-Rip1-Varianten	29
2.1.9.5 Klonierung von pQE32-His-Rip1-Varianten	29
2.1.9.6 Klonierung von pQE32-His-TEV-Rip1-Varianten.....	30
2.2 Methoden der Hefekultur und – genetik	31
2.2.1 Verwendete Hefestämme	31
2.2.2 Kultur von <i>S. cerevisiae</i>	32
2.2.3 Bestimmung von Wachstumsphänotypen in <i>S. cerevisiae</i>	33
2.2.3.1 Bestimmung des Wachstums in Flüssigkultur	33

2.2.3.2 Bestimmung des Wachstums auf festen Medien (Tüpfeltest).....	34
2.2.4 Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	34
2.2.5 Herstellung von Deletionsstämmen	35
2.3 Zellbiologische Untersuchungsmethoden	35
2.3.1 Schnell-Mitochondrienpräparation	35
2.3.2 Mitochondrienpräparation.....	36
2.3.3 Untersuchungen zur Protease-Sensitivität.....	36
2.3.4 Import radiokativ markierter Proteine in isolierte Mitochondrien.....	37
2.4 Proteinchemische Untersuchungsmethoden.....	38
2.4.1 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure	38
2.4.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	38
2.4.3 Expression und Anreicherung rekombinanter Proteine.....	38
2.4.3.1 Anreicherung von His ₆ -markiertem Rip1-Varianten	38
2.4.3.2 Anreicherung von His-TEV(S219V)-Arg	39
2.4.3.3 Anreicherung des Bcs1-Antigens.....	40
2.4.4 Expression und Anreicherung von Proteinen aus Hefe	40
2.4.4.1 Anreicherung von His-Bcs1.....	40
2.4.4.2 Anreicherung von His-Rip1	41
2.4.5 Verdau mit der TEV-Protease.....	42
2.4.6 Chemische Quervernetzung mit Glutaraldehyd.....	42
2.4.7 Test zur Interaktion von Bcs1 und Rip1 in Mitochondrienlysaten	42
2.4.8 Synthese mitochondrialer Vorläuferproteine in Retikulozytenlysat.....	43
2.4.9 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
2.4.10 Nativgelelektrophorese (Blue native PAGE).....	44
2.4.11 Coomassie-Blau-Färbung von SDS-Gelen	45
2.4.12 Transfer von Proteinen auf Membranen (Western Blot)	45
2.4.13 Autoradiographie	45
2.5 Immunologische Untersuchungsmethoden	46
2.5.1 Eingesetzte Antikörper	46
2.5.2 Affinitätsreinigung von Antikörpern.....	46
2.5.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen	47
2.6 Chemikalien	48
2.7 Enzyme	51
2.8 Kits	52
2.9 Puffer und Lösungen	52

2.10 Verbrauchsmaterial	55
2.11 Zelllinien	56
3. Ergebnisse	58
3.1 Funktionelle Charakterisierung von Bcs1	58
3.1.1 Charakterisierung des BCS1-Komplexes.....	58
3.1.1.1 Anreicherung des nativen BCS1-Komplexes.....	58
3.1.1.2 Charakterisierung der oligomeren Zusammensetzung des BCS1-Komplexes.....	60
3.1.2 Biochemische Charakterisierung von BCS1	62
3.1.2.1 Rip1 geht eine ATP-abhängige Wechselwirkung mit dem BCS1-Komplex ein	62
3.1.2.2 Eine bestehende Wechselwirkung zwischen BCS1 und Rip1 kann durch ATP-Zugabe gelöst werden	64
3.1.2.3 Eine ATP-Hydrolyse-Mutante von Bcs1 kann Rip1 nicht freisetzen	65
3.2 Analyse der Wechselwirkung zwischen BCS1 und Rip1 mit isolierten Mitochondrien.....	67
3.2.1 Analyse der Rip1-Assemblierung mithilfe von Deletionsmutanten	67
3.2.2 Die Assemblierung von Rip1 kann in isolierten Mitochondrien nachvollzogen werden	68
3.2.3 Nachweis der Wechselwirkung zwischen Rip1 und BCS1 in Wildtyp-Mitochondrien	69
3.2.4 Nachweis der Wechselwirkung zwischen Rip1 und BCS1 in Δcyt1 -Mitochondrien	71
3.3 Identifizierung von Bereichen des Rip1-Proteins, die für die Wechselwirkung mit BCS1 erforderlich sind	72
3.3.1 Die N-terminale Transmembrandomäne von Rip1 spielt bei der Interaktion mit BCS1 eine entscheidende Rolle	72
3.3.2 Die Faltung des Rip1-Proteins ist Voraussetzung für die Wechselwirkung mit BCS1 in intakten Zellen.....	74
3.3.2.1 Mutation der C-terminalen Domäne von Rip1 beeinträchtigt die Faltung	74
3.3.2.2 Der C-terminale Bereich von Rip1 ist wichtig für die Faltung	75
3.3.2.3 BCS1 trägt zwei Erkennungsstellen für Rip1	80
3.4 Die Transmembrandomäne von Bcs1 spielt eine Rolle bei der Interaktion von BCS1 mit Rip1 .	84
4. Diskussion	86
4.1 Bcs1 ist eine Translokase für Rip1	86
4.2 Welche molekularen Eigenschaften von Bcs1 sind für die Translokase-Funktion nötig?	88
4.2.1 Die Oligomerisierung von Bcs1.....	88
4.2.2 Die Walker-Box B ist für die Freisetzung von Rip1 erforderlich	89
4.2.3 Die Transmembrandomäne von Bcs1 vermittelt eine Konformationsänderung	91
4.3 Wie wird Rip1 über die innere Membran der Mitochondrien transloziert?	93
4.4 Gibt es eine Qualitätskontrolle bei der Rip1-Translokation?	95

4.5 Warum hat BCS1 das TAT-System in Mitochondrien ersetzt?	97
4.5.1 Evolutionäre Gesichtspunkte	97
4.5.2 Befunde zu alternativen BCS1-Funktionen.....	98
5. Abkürzungen	101
6. Danksagung	105
7. Lebenslauf	106
8. Literaturverzeichnis	108

0. Zusammenfassung

Bcs1 ist ein AAA-Protein (*ATPases Associated with diverse cellular Activities*) und fungiert als Translokase für das Rieske-Eisen-Schwefel-Protein (Rip1), einer Komponente des Komplexes III der Atmungskette. Nach der Synthese an cytosolischen Ribosomen wird Rip1 vollständig in die mitochondriale Matrix importiert. Von dort wird es mithilfe von Bcs1 über die Innenmembran transloziert, um seine endgültige Topologie einzunehmen. Die C-terminale Domäne ist dabei zum Intermembranraum orientiert, der N-Terminus zur Matrix. Da nichts über den Mechanismus dieser Translokation bekannt war, sollte in der vorliegenden Arbeit die molekulare Funktion von Bcs1 untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Struktur und Wechselwirkung mit dem Substrat Rip1 analysiert.

Durch chemische Vernetzung von Bcs1-Monomeren mit Glutaraldehyd wurde ein hexameres Homooligomer (BCS1) nachgewiesen. Vorläufige Daten von elektronenmikroskopischen Untersuchungen belegen einen zentralen Kanal im BCS1-Komplex. Wahrscheinlich wird Rip1 durch diesen zentralen Kanal im BCS1-Komplex transloziert.

Biochemische Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen BCS1 und Rip1 wurden mit lysierten Mitochondrien und isoliertem BCS1 durchgeführt. Sowohl der isolierte BCS1-Komplex als auch BCS1 in lysierten Mitochondrien binden Rip1 und setzen es unter ATP-Hydrolyse wieder frei. Diese Bindung ist mit einer Konformationsänderung von BCS1 verbunden.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde untersucht, welche Bereiche von Rip1 die Wechselwirkung mit BCS1 vermitteln. Sowohl in isolierten Mitochondrien als auch in intakten Zellen ist die gefaltete C-terminale Domäne von Rip1 für die Bindung an BCS1 erforderlich. Dagegen war bei Experimenten mit lysierten Mitochondrien und isoliertem BCS1 nur das N-terminale Segment von Rip1 erforderlich, um die angesprochene Konformationsänderung von BCS1 auszulösen. Diese Diskrepanz konnte aufgelöst werden: Während gefaltetes Rip1 bevorzugt an die C-terminale AAA-Domäne von BCS1 bindet, ist dies dem ungefalteten Rip1 nicht möglich. Allerdings kann die Transmembrandomäne des ungefalteten Rip1 noch mit dem Transmembranbereich von gereinigtem oder solubilisiertem BCS1 interagieren. Die Interaktion der Transmembrandomänen beider Proteine induziert eine Konformationsänderung im BCS1-Komplex, die vermutlich notwendig für die Freisetzung von Rip1 ist.

In der vorliegenden Arbeit wird ein Modell zur Translokation vorgeschlagen, demzufolge Rip1 in der Matrix mit seiner gefalteten C-terminalen Domäne, die das Eisen-Schwefel-Cluster trägt, eine erste Wechselwirkung zu BCS1 herstellt. Diese Wechselwirkung initiiert den Translokationsvorgang, durch den Rip1 bis auf die Aminosäuren am N-Terminus aus der Matrix befördert wird. Sobald die Transmembrandomäne von Rip1 mit der Transmembrandomäne von BCS1 interagieren kann, kommt es zur Konformationsänderung in BCS1 und Rip1 wird unter Hydrolyse von ATP in die Innenmembran freigesetzt. Die Freisetzung erfolgt unabhängig von der Vorstufe des Komplexes III, in die Rip1 assembliert wird.

1. Einleitung

1.1 Das Rieske-Eisen-Schwefel-Protein

1.1.1 Topologie des Rieske-Eisen-Schwefel-Proteins

Das Rieske-Eisen-Schwefel-Protein der Mitochondrien ist eine katalytisch aktive Komponente der Atmungskette (Rieske et al., 1964), die in der mitochondrialen Innenmembran lokalisiert ist. In der Bäckerhefe bildet das Rieske-Eisen-Schwefel-Protein (Rip1) zusammen mit neun weiteren Untereinheiten Komplex III der Atmungskette (Ubichinol-Cytochrom *c*-Oxidoreduktase oder Cytochrom-*bc*₁-Komplex) (Brandt et al., 1994). In Säugern enthält der Komplex eine elfte Untereinheit (Brandt et al., 1993). Die Struktur von Komplex III aus Hefe (Hunte et al., 2000) und Rind (Yu et al., 1996) wurde röntgenkristallographisch aufgeklärt. Der Komplex liegt funktionell als Homodimer vor, in dessen Membranregion sich die Membrananker der beiden Rieske-Proteine überkreuzen (Hunte et al., 2000). Die C-terminale Rip1-Domäne mit dem Eisen-Schwefel-Cluster liegt im Intermembranraum, während der N-Terminus dem Matrixraum zugewandt ist.

Komplex III liegt nicht nur als isoliertes Homodimer vor, sondern vor allem als Teil von Superkomplexen, die aus einem Dimer von Komplex III und einer (III₂ + IV) oder zwei Kopien von Komplex IV (III₂ + IV₂) bestehen (Mick et al., 2007, Zara et al., 2007). Deletiert man Rip1 ($\Delta rip1$), entsteht nur eine Vorstufe von Komplex III (Präkomplex p-III), die unabhängig von Rip1 dimerisieren kann (p-III₂), aber nicht als Bestandteil von Superkomplexen fungieren kann. Diese Vorstufen (p-III und p-III₂) enthalten alle weiteren Untereinheiten bis auf Rip1 und Qcr10 (Crivellone et al., 1988, Grivell, 1989). Zahlreiche Untersuchungen zeigten, dass dieser Präkomplex tatsächlich ein Assemblierungsintermediat darstellt, das im weiteren Verlauf Rip1 als vorletzte und Qcr10 als letzte Untereinheit aufnimmt (Zara et al., 2009). Die Frage, die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegt, ist, wie Rip1 in die Innenmembran inseriert und in die beschriebene Komplex III-Vorstufe assembliert wird.

Proteine der mitochondrialen Innenmembran mit N-terminaler Transmembrandomäne können im Wesentlichen durch zwei Mechanismen an ihren Zielort gelangen. Erstens kann die Transmembrandomäne beim Import durch die Translokase der Innenmembran (TIM23) als „Stop-Transfer-Signal“ dienen. Dabei wird der Importvorgang gestoppt, wenn die Transmembrandomäne auf Höhe der Membran ist. Dann kommt es zur lateralen Freisetzung in die Membran. Ein Beispiel für diesen Weg ist Cytochrom *b*₂, das nach der lateralen

Freisetzung noch proteolytisch prozessiert wird (Glick et al., 1992). Bezüglich seiner Topologie könnte Rip1 ein Substrat dieses Weges sein. Zweitens kann die Transmembrandomäne als Signal für die sekundäre Membraninsertion von der Matrix aus dienen. Dieser Mechanismus wurde insbesondere bei Oxa1-Substraten (inklusive Oxa1 selbst) beobachtet. Oxa1 ist eine Proteintranslokase, die in Assoziation mit mitochondrialen Ribosomen vorliegt und Proteine in die mitochondriale Innenmembran inseriert. Tatsächlich ist Rip1 ein Substrat dieses zweiten Weges, allerdings sind andere Faktoren beteiligt (s. Kapitel 1.3.2).

1.1.2 Rieske-Proteine in Elektronen-übertragenden Komplexen

Rieske-Proteine sind weit verbreitete Elemente von Elektronentransportsystemen (Schütz et al., 2000, Lebrun et al., 2006). In Bakterien gibt es Komplexe in der Plasmamembran, die homolog zum Komplex III der Atmungskette (Cytochrom-*bc₁*-Komplex) sind und das Rieske-Protein beinhalten. In Chloroplasten und Cyanobakterien ist das Rieske-Protein Teil des Cytochrom-*b₆f*-Komplexes, der homolog zum Cytochrom-*bc₁*-Komplex ist. Auch in Archäen findet man das Rieske-Protein als Elektronenüberträger vor (Schmidt and Shaw, 2001). Die prokaryotischen Cytochrom-*bc₁*-Komplexe bestehen meist nur aus den katalytischen Untereinheiten Cytochrom *b*, Cytochrom *c₁* und dem Rieske-Eisen-Schwefel-Protein (Smith et al., 2012). Die Assemblierung der Cytochrom-*bc₁*-Komplexe erfolgt auch in Bakterien schrittweise. Wie in Eukaryoten wird das Rieske-Protein auch hier als letzte Untereinheit hinzugefügt (Davidson et al., 1992, Van Doren et al., 1993). Die Vorstufe aus Cytochrom *b* und Cytochrom *c₁*, die das Rieske-Protein aufnimmt, ist auffallend stabil und resistent gegen Proteasebehandlung (Davidson et al., 1992).

In einigen Archäen und Bakterien gibt es mehrere Isoformen des Rieske-Proteins. In *Acidithiobacillus ferrooxidans* gibt es zum Beispiel zwei Isoformen, die in zwei unterschiedlichen Cytochrom-*bc₁*-Komplex vorzuliegen scheinen (Elbehti et al., 1999, Elbehti et al., 2000, Brasseur et al., 2002, Brasseur et al., 2004). Man nimmt an, dass diese Komplexe in entgegengesetzter Richtung arbeiten, das heißt einer oxidiert, der andere reduziert Cytochrom *c*. Allgemein sollen verschiedene Rieske-Proteine den Organismen erlauben, ihre Elektronentransferketten je nach Stoffwechsellaage an veränderte Umweltbedingungen anzupassen (Schneider and Schmidt, 2005).

1.2 Posttranslationale Modifizierungen von Rip1

Das Rieske-Protein ist im Zellkern kodiert und wird im Cytosol synthetisiert. Eine N-terminale Präsequenz sorgt für den Import in die Mitochondrien (Hartl et al., 1986, Attardi and Schatz, 1988, Pfanner and Neupert, 1990). Dort erfolgt im Schimmelpilz *Neurospora crassa* (Hartl et al., 1986) und in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Fu et al., 1990) eine erste proteolytische Prozessierung (Abspaltung von 24 bzw. 22 Aminosäuren) durch die Matrix-Prozessierungspeptidase (MPP), gefolgt von der Abspaltung eines Octapeptids durch die intermediäre Prozessierungspeptidase (MIP). In Säugern erfolgt die Abspaltung der Präsequenz in einem Schritt und das abgespaltene Peptid bleibt als Untereinheit des reifen Komplexes III erhalten (Smith et al., 2012).

Die C-terminale Domäne von Rip1 trägt ein Eisen-Schwefel-Cluster, das zum Intermembranraum exponiert ist. Die Maschinerie für die Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern ist allerdings in der Matrix lokalisiert (Lill and Mühlenhoff, 2006). Tatsächlich wird Rip1 zunächst vollständig in die Matrix importiert (Hartl et al., 1986, Golik et al., 2003, Wagener et al., 2011), wo dann die Aufnahme des Eisen-Schwefel-Clusters erfolgt (Mühlenhoff et al., 2011). Demnach muss Rip1 mit gebundenem Cofaktor transloziert werden. Vor Beginn dieser Arbeit war nur ein Translokationssystem bekannt, das Proteine mit gebundenen Cofaktoren zum Substrat hat. Dabei handelt es sich um das TAT-System (s. Kapitel 1.4.1), das in Mitochondrien nicht vorhanden ist.

Die Biosynthese von Eisen-Schwefel-Clustern findet in der Matrix statt (Lill and Mühlenhoff, 2006). Während Fe^{2+} wahrscheinlich in die Matrix importiert wird, führt die Umwandlung von Cystein zu Alanin vor Ort zur Bereitstellung von Sulfid. Unter Beteiligung des Chaperons Ssq1 werden beide Komponenten an Gerüstproteinen (Isu1/2 in Hefe) zu Clustern zusammengebaut. Die Apoproteine müssen in einer Konformation gehalten werden, die für die Anknüpfung des Clusters geeignet ist. Dies wird durch Chaperone bewerkstelligt. Vor diesem Hintergrund erscheint es nicht überraschend, dass auch Rip1 sein Eisen-Schwefel-Cluster in der Matrix bindet (Mühlenhoff et al., 2011). Aus diesem Grund muss Rip1 vollständig in die Matrix importiert werden, bevor es in den Komplex III in der inneren Mitochondrienmembran integriert wird. Dies wurde *in vivo* und *in vitro* bestätigt (Hartl et al., 1986, Golik et al., 2003, Wagener et al., 2011). Vor Beginn dieser Arbeit war dies u.a. aus Komplementationsstudien gefolgert worden: Das Gen für das Rieske-Protein (*RIP1*) wurde erfolgreich in die mitochondriale DNA integriert und in der Matrix exprimiert. In diesen Experimenten konnte das mitochondrial erzeugte Rip1 die Deletion des nuklären Gens (Δrip1) komplementieren (Golik et al., 2003). Diese Beobachtung unterstützte die Hypothese,

nach der im Cytosol erzeugtes Rieske-Protein zunächst in die mitochondriale Matrix gelangt und von dort „exportiert“ werden muss, um in den Komplex III eingefügt zu werden. Bemerkenswert an diesem Export ist die Tatsache, dass Rip1 mit gebundenem Cofaktor exportiert werden muss.

1.3 Die Biogenese von Rip1: Stand der Forschung

1.3.1 Das „*Twin arginine translocation*“(TAT)-System

Sowohl in Chloroplasten als auch in Bakterien wird das Rieske-Protein des Cytochrom-*bc₁*-Komplexes bzw. des Cytochrom-*b₆f*-Komplexes über das TAT-(twin arginine translocation) System in seine Ziellmembran inseriert. In Chloroplasten wird das Rieske-Protein nach dem Import in das Stroma über das TAT-System in die Thylakoidmembran transloziert (Molik et al., 2001). Das TAT-System kommt neben den Thylakoidmembranen von Pflanzen und Cyanobakterien auch in den Zytoplasmamembranen von Bakterien vor. Benannt ist es nach dem N-terminalen Doppelargininmotiv, das TAT-Substrate tragen. Die auf den Substratproteinen erkannten Signalpeptide bestehen im Allgemeinen nicht nur aus dem Doppelargininmotiv, sondern setzen sich aus drei Segmenten zusammen. Das erste besteht aus einer geladenen N-terminalen Sequenz, das zweite aus einem weitgehend hydrophoben Bereich und das dritte aus einer polaren Sequenz (von Heijne, 1985, Barnett et al., 2011). Während das namensgebende Doppelargininmotiv in Chloroplasten essentiell ist, kann man in *Escherichia coli* ein Arginin mutieren, ohne die TAT-abhängige Translokation auszuschalten (Buchanan et al., 2001, DeLisa et al., 2002, Mendel et al., 2008, Robinson et al., 2011).

Mit der Ausnahme von *Actinomyceten* (Schaerlaekens et al., 2001) erfordert die molekulare TAT-Maschinerie in Gram-positiven Bakterien zwei Membranproteine (TatA und TatB) für die Translokase-Aktivität (Yen et al., 2002, Dilks et al., 2003). In *Actinomyceten* und Gram-negativen Bakterien ist eine weitere Komponente (TatC) erforderlich (Barnett et al., 2011). Man spricht deshalb auch vom TatABC-Translokationssystem. In *Escherichia coli* gibt es sogar eine vierte Komponente (TatE), deren Funktion noch nicht gänzlich geklärt ist (Robinson et al., 2011). Die Energie für den Translokationsvorgang wird aus dem pH-Gradienten über der jeweiligen Membran bezogen (Mould and Robinson, 1991, Cline et al.,

1992, Klosgen et al., 1992). Dies ist ungewöhnlich, weil Proteintransporter gewöhnlich die Energie aus der Hydrolyse von ATP oder GTP nutzen.

Eine besondere Eigenschaft des TAT-Translokationssystems ist die Fähigkeit, gefaltete Proteine mit gebundenen Cofaktoren zu transportieren (Mould and Robinson, 1991, Cline et al., 1992, Berks, 1996, Weiner et al., 1998, Robinson and Bolhuis, 2004, Gohlke et al., 2005, Muller and Klosgen, 2005, Palmer et al., 2005). Man nimmt an, dass dies v.a. bei der Biogenese von Metalloproteinen eine entscheidende Rolle spielt (Barnett et al., 2011). Bei Bakterien ist im Cytoplasma nämlich eine kontrollierte, durch Chaperone katalysierte Bindung des/der spezifischen Metallions/en möglich, während im Periplasma die Bindung unerwünschter Metallionen nicht vermieden werden könnte bzw. keine Bindung erreicht würde. Deshalb müssen die Proteine ihre Cofaktoren bereits im Cytoplasma binden und können nicht als Apoproteine transloziert werden. Neben gefalteten Proteinen können auch vorgefertigte Proteinkomplexe vom TAT-System transloziert werden, wie das Beispiel des Komplexes aus DmsA und DmsB in *Escherichia coli* zeigt (Papish et al., 2003).

Einige TAT-Substrate, wie z.B. das Rieske-Protein, sind integrale Membranproteine. Aus diesem Grund spielt das TAT-System nicht nur bei der Proteintranslokation, sondern auch bei der Insertion von Membranproteinen eine Rolle. Eine Besonderheit bei der TAT-vermittelten Translokation des Rieske-Proteins in Chloroplasten ist, dass das charakteristische Doppelargininmotiv durch ein Lysin-Argininmotiv ersetzt ist (Gutensohn et al., 2006). Die Effizienz der TAT-vermittelten Translokation ist deshalb herabgesetzt und es kommt zu einer transienten Akkumulation des Proteins im Stroma (Molik et al., 2001). Während dieser Akkumulationsphase wird vermutlich das Eisen-Schwefel-Cluster angeknüpft. Diese Vermutung wird unterstützt von experimentellen Daten, die eine Bindung des Rieske-Proteins an hochmolekulare Komplexe belegen (Molik et al., 2001).

1.3.2 Die Rolle von Bcs1

Da Mitochondrien kein TAT-System besitzen, muss der Export des Rieske-Proteins aus der Matrix durch einen anderen Translokationsmechanismus vermittelt werden. Ein grundlegender Aspekt der Biogenese von Rip1 ist die Bindung eines Eisen-Schwefel-Clusters in der mitochondrialen Matrix. Da Oxa1 nicht am Export von Rip1 beteiligt ist (Wagener et al., 2011), muss ein anderes Translokationssystem diese Funktion übernehmen. Erste Indizien für dieses System entstammen der Untersuchung von Hefemutanten (pet-Mutanten) mit Atmungsdefiziten (Nobrega et al., 1992). pet-Mutanten, bei

denen der *BCS1*-Lokus mutiert war, wiesen eine Funktionsstörung von Komplex III auf. Weitere Analysen zeigten, dass die Konzentration des Rieske-Proteins in Mitochondrien verringert war, während die anderen Untereinheiten des Cytochrom-*bc₁*-Komplexes in normalen Konzentrationen vorhanden waren. Die Expression des *RIP1*-Gens von einem Plasmid kompensierte den Mangel an mitochondrialem Rieske-Protein, konnte aber den enzymatischen Defekt nicht beheben (Nobrega et al., 1992). Wie weitergehende Untersuchungen zeigten, akkumuliert Rip1 in $\Delta bcs1$ -Mitochondrien in der Matrix. Dieses Rip1 ist gefaltet, kann aber nicht in Komplex III assembliert werden (Wagener et al., 2011). In früheren Studien wurde die Hypothese formuliert, Bcs1 könne als Platzhalter für Rip1 fungieren und die Vorstufe des Komplexes III (Präkomplex p-III) somit in einem kompetenten Zustand für die Assemblierung von Rip1 halten. Dieser Hypothese zufolge würde die Translokationsfunktion vom Präkomplex selbst übernommen und Bcs1 spielte die Rolle eines Chaperons (Cruciat et al., 1999).

Die Untersuchung der Rip1-Lokalisation in einem Cytochrom *c₁*-Deletionsstamm ($\Delta cyt1$) konnte diese Hypothese widerlegen und im Zusammenhang mit den Befunden aus $\Delta bcs1$ -Mitochondrien die Funktion von Bcs1 als Translokase stützen. Eine Deletion von Cytochrom *c₁* ($\Delta cyt1$) hat zur Folge, dass sich diejenigen Vorstufen von Komplex III (p-III und p-III₂) nicht bilden können, die Rip1 aufnehmen. Rip1 kann also nicht assembliert werden. Anders als in Mitochondrien ohne Bcs1 ($\Delta bcs1$) ist Rip1 aber nicht in der Matrix vorzufinden, sondern exponiert wie das reife, im Komplex III assemblierte Protein seine C-terminale Domäne zum Intermembranraum. Eine Reihe von Experimenten zeigte, dass Rip1 mit der Innenmembran assoziiert, aber nicht an Bcs1 gebunden ist (Wagener et al., 2011). Daraus wurde geschlossen, dass Rip1 in $\Delta cyt1$ -Mitochondrien nach dem Import in die Matrix von Bcs1 über die Innenmembran transloziert und anschließend in die Membran freigesetzt wird. Vor Beginn dieser Arbeit war die für die Translokation erforderliche Wechselwirkung zwischen Bcs1 und Rip1 nicht gezeigt worden.

1.4 Topologie und strukturelle Elemente von Bcs1

Bcs1 gehört zur Familie der AAA-Proteine (*ATPases Associated with diverse cellular Activities*). Es ist in Pilzen, Pflanzen und Tieren konserviert, aber kommt bei Eubakterien und Archäen nicht vor. AAA-Proteine bilden gewöhnlich Oligomere (Rouiller et al., 2000, Ogura and Wilkinson, 2001, Guo et al., 2002, Wendler et al., 2007, Davies et al., 2008, Bieniossek et al., 2009), die ihre Konformation teilweise drastisch verändern können. Diese Konformationsänderungen gehen mit Nukleotidbindung und –hydrolyse einher (Hanson and Whiteheart, 2005, Wendler et al., 2009).

Es ist auffallend, dass Bcs1 wenig Homologie zu anderen AAA-Proteinen zeigt. Die Transmembrandomäne findet beispielsweise keine Entsprechung in der AAA-Familie. Darüberhinaus trägt Bcs1 eine mitochondriale Signalsequenz und eine zusätzliche Importsequenz, die C-terminal von der Transmembrandomäne liegen und nicht proteolytisch abgespalten werden, wie das z.B. bei der Signalsequenz von Rip1 der Fall ist. Man nimmt an, dass diese beiden Signalsequenzen beim Import durch den TOM-Komplex eine Schleife bilden (Stan et al., 2003). Danach sind sowohl die Signalsequenz, die zusätzliche Importsequenz als auch die Transmembrandomäne für eine korrekte Sortierung von Bcs1 in die Innenmembran nötig.

Bcs1 durchspannt die innere Mitochondrienmembran in der Art, dass der N-Terminus in den Intermembranraum ragt, während die C-terminale AAA-Domäne zur Matrix gerichtet ist (Fölsch et al., 1996). Der N-Terminus scheint nur bei Hefe vorhanden zu sein, während homologe Bcs1-Proteine (bis auf wenige Aminosäuren) unmittelbar mit der Transmembrandomäne beginnen. In früheren Studien wurden N-terminale Deletionen von Bcs1 untersucht (Fölsch et al., 1996). Die Expression von $\Delta 40$ Bcs1 in einem $\Delta bcs1$ -Hintergrund macht Wachstum auf obligat aeroben Kohlenstoffquellen wieder möglich. Dagegen kann eine Variante, bei der die Transmembrandomäne fehlt ($\Delta 65$), den Phänotyp des $\Delta bcs1$ -Stammes nicht komplementieren. Da Rip1 von BCS1 über die innere Mitochondrienmembran transloziert werden muss, ist es leicht vorstellbar, dass dies ohne Membranverankerung nicht mehr funktioniert.

Die AAA-Domäne ist bei allen AAA-Proteinen stark konserviert und trägt zwei charakteristische Motive (Walker A und B), die für Nukleotidbindung und –hydrolyse unerlässlich sind (s. Abb 1.1).

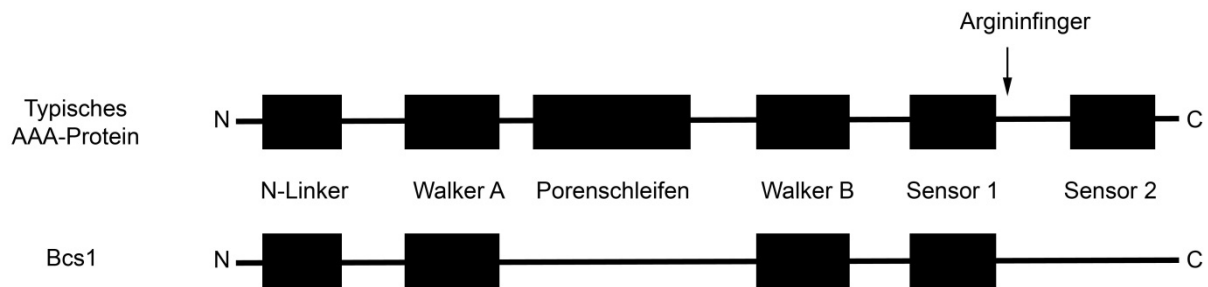


Abb. 1.1: Charakteristische Motive von AAA-Proteinen und Bcs1

Zu den Motiven, die AAA-Proteine kennzeichnen, gehören der N-Linker, die Walker-Motive A und B, Porenschleifen sowie Sensor 1 und 2. Porenschleifen und Sensor 2 sind auf Bcs1 nicht vorhanden.

Studiert man die Kristallstruktur des AAA-Proteins NSF/Sec18 (Lenzen et al., 1998) versteht man warum dies so ist. Ein Lysinrest (K273 bei Bcs1) im Walkermotiv A (GXXXXGK[T/S]) interagiert mit den Phosphaten von ATP und vermittelt so die Bindung des Nukleotids. Ein Glutamatrest (E319 bei Bcs1) im Walkermotiv B (hhhhDE, h steht für hydrophobe Aminosäuren) aktiviert vermutlich Wassermoleküle für die ATP-Hydrolyse. Ein weiteres Motiv ist der Sensor 1 (s. Abb. 1.1), der einen polaren Rest (meist Threonin) enthält. Bei NSF/Sec18 interagiert der Sensor 1 mit dem γ -Phosphat von gebundenem ATP. Schließlich enthält Bcs1 zwei Arginine (R376 und R379), von denen eines einen Argininfinger formt (s. Abb. 1.1), der vermutlich zur benachbarten Untereinheit reicht und dort Teil der Nukleotidbindestelle ist. Argininfinger sind Motive, die von GTPase-aktivierenden Proteinen bekannt sind (Scheffzek et al., 1997), aber auch charakteristisch für AAA-Proteine sind (Ogura et al., 2004). Ersetzt man im AAA-Protein p97 die Argininfinger durch negativ geladene Aminosäuren, so sind Substratbindung und Oligomerisierung beeinträchtigt (Wang et al., 2005). N-terminal von der AAA-Domäne liegt der N-Linker. Diese Region soll die nukleotidabhängigen Konformationsänderungen auf andere Teile des Proteins weiterleiten (Hanson and Whiteheart, 2005).

Innerhalb der Familie der AAA-Proteine ist Bcs1 ein Außenseiter und wird als einziges Mitglied einer eigenen Subfamilie zugeordnet (Frickey and Lupas, 2004). Bcs1 unterscheidet sich in der Tat in einigen Aspekten grundlegend von anderen AAA-Proteinen. Erstens hat es nur eine AAA-Domäne, wogegen die Mehrheit der AAA-Proteine zwei dieser Domänen besitzen. Zweitens besitzt es keine Porenschleifen (s. Kapitel 1.5), die bei der Bindung und Translokation von Substratmolekülen bisher charakterisierter AAA-Proteine eine entscheidende Rolle spielen (Hinnerwisch et al., 2005, Martin et al., 2008). Weiterhin fehlt

der Sensor 2, der an der ATP-Binding beteiligt ist. Sowohl der Sensor 2 als auch die Porenschleifen sind nachweislich in den Transport von Substraten verwickelt (Joshi et al., 2003). Da beide Elemente in Bcs1 fehlen, muss Bcs1 in gänzlich anderer Weise mit seinen Substraten interagieren. Es gibt Befunde zu einer Bcs1-Mutation (F342C), die den Komplex inaktiviert, so dass Rip1 nicht in den Komplex III assembliert wird. Die mutierte Stelle liegt nahe einem Bereich, der als Porenregion postuliert wurde (Nouet et al., 2009).

1.5 Funktionsweise von AAA-Proteinen

Die große Mehrzahl der AAA-Proteine bilden Hexamere (Rouiller et al., 2000, Ogura and Wilkinson, 2001, Guo et al., 2002, Wendler et al., 2007, Davies et al., 2008, Bieniossek et al., 2009). Darüberhinaus gibt es heptamere Strukturen wie RuvB (Miyata et al., 2000) und hexamere Ringe, die sich zu Dodecameren zusammenlagern wie Vps4 (Landsberg et al., 2009). Viele AAA-Proteine translozieren entfaltete Substratproteine durch einen zentralen Kanal, der von einer oligomeren Ringstruktur umschlossen wird (Hoskins et al., 2001, Jarosch et al., 2002, Sauer et al., 2004, White and Luring, 2007, Mogk et al., 2008). Die Substratmoleküle werden in den meisten Fällen vor der Translokation entfaltet, wofür die Energie aus der Hydrolyse von ATP benötigt wird. Neuere Untersuchungen zeigen, dass manche AAA-Proteine auch Polypeptidschleifen aufnehmen können (Burton et al., 2001, Hoskins et al., 2002, Glynn et al., 2009). In dem Maße, wie die Substratstruktur variiert, variiert der Durchmesser des zentralen Kanals. ClpA beispielsweise transloziert entfaltete Proteine, die zum Abbau bestimmt sind. Berechnungen zufolge kann die Pore von ClpA maximal 0,9 nm im Durchmesser sein (Guo et al., 2002). Der zentrale Kanal von Hsp104 (genauer des NBD-Rings) dagegen kann einen Durchmesser von bis zu 7,8 nm annehmen (Wendler et al., 2009). Hsp104 löst Proteinaggregate auf.

Wie das Beispiel von Hsp104 zeigt, gibt es neben Entfaltung und proteolytischem Abbau von Substratproteinen (z.B. ClpA) weitere von AAA-Proteinen katalysierte Reaktionstypen. Erstens werden Proteinaggregate aufgelöst, die sich aus fehlgefalteten Proteinen zusammensetzen und besonders unter Stressbedingungen anfallen (z.B. Hsp104). Zweitens können auch funktionelle Proteinkomplexe wie die SNAREs aufgelöst werden (z.B. NSF). Schließlich sei noch erwähnt, dass einige AAA-Proteine (z.B. T7-Helikase) nicht Proteine, sondern Polynukleotide als Substrate haben. Die T7-Helikase ist eine Helikase, die ihre Ringstruktur lateral öffnen und so DNA aufnehmen oder freisetzen kann (Ahnert et al., 2000).

In allen Fällen ist ATP-Hydrolyse für die Funktion der AAA-Proteine erforderlich. Wird die ATP-Hydrolyse-Stelle durch eine Mutation (E→Q) inaktiviert, bleiben bei verschiedenen AAA-Proteinen die Substrate stecken (Babst et al., 1998, Weibezahn et al., 2003, Dalal et al., 2004), weshalb der Begriff der „Substratfalle“ geprägt wurde (Hanson and Whiteheart, 2005). Wie die angesprochenen Reaktionen auf atomarer Ebene durch ATP-Hydrolyse vorangetrieben werden, ist erst ansatzweise verstanden. Für die ClpA-vermittelte Translokation wurde ausgehend von funktionellen Studien und Versuchen mit chemischen Vernetzern ein Modell vorgeschlagen (Hinnerwisch et al., 2005). Demnach werden Substrate über drei Schleifen (Porenschleifen) gebunden, die in die zentrale Translokationspore des ClpA-Oligomers ragen. ClpA besitzt zwei AAA-Domänen (D1 und D2), die beide Porenschleifen ausbilden (D1 zwei, D2 eine). ATP-Hydrolyse soll allerdings nur in einer Domäne (D2) stattfinden. Dabei kommt es im vorgeschlagenen Modell zu einer strukturellen Umordnung der Porenschleife, so dass eine mechanische Kraft auf das Substratprotein ausgeübt wird. So bewirkt jede ATP-Hydrolyse einen inkrementellen Translokationsfortschritt und begünstigt gleichzeitig die Entfaltung derjenigen Anteile des Substratproteins, die noch in gefalteter Form außerhalb der Pore vorliegen. Von anderen AAA-Proteinen weiß man, dass sich die physikalischen Eigenschaften der Oberflächen verändern, die vermutlich die Wechselwirkung mit dem Substrat vermitteln (DeLaBarre and Brunger, 2005). Dies erinnert an Chaperonine (z.B. GroEL/GroES) und in der Tat wurde für manche AAA-Proteine (z.B. ClpX/A, Proteasom, Yme1) eine Chaperon-Aktivität nachgewiesen (Leonhard et al., 1999, Hanson and Whiteheart, 2005).

Die initiale Substratbindung erfordert keine ATP-Hydrolyse (Ogura and Wilkinson, 2001) und wird durch Erkennungsmotive vermittelt. Die am besten charakterisierte Erkennungssequenz für AAA-Proteine ist die des Proteasekomplexes ClpA. Es handelt sich dabei um ein Peptid der Sequenz AANDENYALAA, das oft als „ssrA-Tag“ bezeichnet wird. Dieser Tag stellt das funktionelle Analogon der von Eukaryoten bekannten Polyubiquitinierung dar. Bei anderen AAA-Proteinen ist die Substraterkennung weit weniger verstanden als bei ClpA. Dies hängt auch mit der Heterogenität der Substrate zusammen. Viele AAA-Proteine lösen Proteinaggregate auf, die sich unter Stressbedingungen gehäuft bilden. Da es sich dabei um Proteine jeglicher Art handeln kann, ist es schwierig, Erkennungsmotive zu identifizieren. Dennoch weiß man, dass in einigen Fällen Sequenzen hydrophober oder aromatischer Aminosäuren erkannt werden (Hanson and Whiteheart, 2005).

Bei den genannten Erkennungsmotiven scheint es sich um lineare Motive zu handeln. Anders verhält es sich bei den oben erwähnten Polyubiquitinketten, die von der 19S-Untereinheit des Proteasoms erkannt werden. Die 19S-Untereinheit besteht aus 20 Komponenten, von denen sechs AAA-Proteine sind. Die Funktion dieser AAA-Proteine ist

noch nicht abschließend geklärt. Vermutlich spielen sie eine Rolle bei der Entfaltung der Substrate des Proteasoms. Falls sie auch bei der Erkennung der Substrate beteiligt sind, muss diese durch dreidimensionale Motive vermittelt werden. Erkannt werden nämlich Polyubiquitinketten, die aus mehreren, über Isopeptidbindungen verknüpfte Kopien des gefalteten Ubiquitins bestehen. Die genauen Erkennungsmotive sind bei den meisten AAA-Proteinen bisher nicht aufgeklärt worden, aber in vielen Fällen ist es wahrscheinlich, dass dreidimensionale Strukturen erkannt werden. Beispielsweise löst das AAA-Protein NSF die sogenannten SNARE-Komplexe auf, die sich bei Membranfusionen oder -abschnürungen bilden. Die SNAREs bilden dabei ein extrem stabiles Vier-Helix-Bündel aus. Es ist unwahrscheinlich, dass NSF dieses Substrat ausschließlich anhand linearer Erkennungssequenzen identifiziert.

2. Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 DNA-Präparation aus *E. coli*

DNA aus *E. coli* wurde im kleinen Maßstab mittels alkalischer Lyse (Birnboim and Doly, 1979) und im großen Maßstab mit dem Pure Yield™ Plasmid Midiprep System (Promega) präpariert.

Für die alkalische Lyse wurden Übernachtskulturen von *E. coli*-Einzelkolonien (LB_{Amp}-Medium s. Kapitel 2.9), 37°C) geerntet (30 s, 10.000 g, RT), in 50 µl sterilem Wasser aufgenommen und mit 300 µl Lysepuffer A (s. Kapitel 2.9) versetzt. Die Lyse erfolgte für 5 min bei Raumtemperatur. Das Zelllysate wurde anschließend mit 150 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,8) vermischt. Ausgefällene Proteine konnten dann durch einen Zentrifugationsschritt (10 min, 15.000 g, 4°C) entfernt werden. Die DNA wurde aus dem Überstand durch Zugabe des zweifachen Volumens Ethanol für 20 min bei -20°C präzipitiert und anschließend durch Zentrifugation (10 min, 15.000 g, 4°C) pelletiert. Das so gewonnene DNA-Pellet wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Schließlich wurde die DNA in sterilem Wasser aufgenommen (meist 100 µl).

Die DNA-Präparation mit dem Pure Yield™ Plasmid Midiprep System (Promega) wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (Isolierung durch Zentrifugation).

2.1.2 DNA-Präparation aus Hefe

Für die DNA-Isolierung wurden Übernachtskulturen von *S. cerevisiae* verwendet, die bei 30°C in YPD-Medium (s. Kapitel 2.2.2, Tabelle 2.3) angezogen wurden. Nach der Ernte (ca. 1,5 ml, 5 min, 5.000 g, RT) wurden die Zellen in 100 µl Wasser aufgenommen. Anschließend wurden 200 µl Lysepuffer B (s. Kapitel 2.9) zugegeben, bevor die Zellwände mithilfe von Glasperlen (Durchmesser 2 mm) aufgebrochen wurden. Der erhaltene Zellaufschluss wurde mit 200 µl Phenol versetzt und mittels Zentrifugation (10 min, 5.000 g, RT) in zwei Phasen getrennt. Die untere Phase wurde verworfen, während die obere mit 100 µl Phenol und 100 µl Chloroform versetzt wurde. Nach Mischen wurde mittels Zentrifugation (10 min, 5.000 g, RT) wieder eine Phasentrennung herbeigeführt. Abermals wurde die untere Phase verworfen und die obere wurde nun mit 200 µl Chloroform vermischt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (10 min, 5.000 g, RT) wurde DNA aus der abgenommenen, oberen

Phase durch Zugabe von 20 µl 3M Natriumacetat (pH 4,5) und 600 µl 100% (v/v) Ethanol ausgefällt. Die Fällung wurde bei -20°C für 20 min durchgeführt. Danach wurde der Ansatz für 15 min bei 19.000 g und 4°C abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und schließlich bei Raumtemperatur getrocknet. Die präparierte DNA wurde in 50-100 µl Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Für einen Reaktionsansatz von 50 µl wurden 2 mM dNTPs, 20 pmol der jeweiligen Primer, 5 µl Pfu-Reaktionspuffer (Promega) und 2,5 U Pfu DNA-Polymerase verwendet. Als Matrize (20-100 ng) diente entweder genomische DNA aus Hefe (s. Kapitel 2.1.2) oder Plasmid-DNA (s. Kapitel 2.1.1). Die DNA wurde zunächst für 5 min bei 95°C denaturiert, bevor der Reaktionszyklus aus Denaturierung (1 min), Matrizenanlagerung der Primer (30 s) und DNA-Synthese (1,5 – 3 min) in vielfacher Wiederholung (in der Regel 30 Zyklen) durchlaufen wurde. Die Denaturierung wurde bei 95°C, die Synthese bei 68°C durchgeführt. Die Temperatur für die Matrizenanlagerung der Primer wurde 3-5°C niedriger als die Schmelztemperatur gewählt. Die Schmelztemperatur wiederum wurde nach folgender Formel unter Berücksichtigung des sich anlagernden Sequenzabschnitts auf den Primern ermittelt:

$$69,3 + 0,41 \cdot \text{GC-Gehalt (in \%)} - \frac{650}{\text{Nukleotidzahl}}$$

Unvollendete DNA-Stränge wurden am Ende durch eine Synthesephase von 10 min bei 68°C vervollständigt.

2.1.4 Restriktionsverdau von DNA

Je nach Zielsetzung wurde DNA präparativ oder analytisch mit Restriktionsenzymen verdaut. Temperatur, Pufferbedingungen und Reaktionszusätze richteten sich nach den Angaben des Herstellers. Für Analyse bzw. Präparation der Restriktionsansätze wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt (s. Kapitel 2.1.5).

Beim analytischen Verdau wurden pro 100 ng DNA 0,2-1 U/µl der jeweiligen Restriktionsenzyme (s. Kapitel 2.7) in einem Volumen von 20 µl verwendet. Der Verdau wurde für 2 h durchgeführt.

Beim präparativen Verdau wurden pro 1 µg DNA 0,2-1 U/µl der jeweiligen Restriktionsenzyme (s. Kapitel 2.7) in einem Volumen von 150 µl eingesetzt. Der Verdau erfolgte in der Regel über Nacht.

Der Verdau wurde durch Zugabe von DNA-Probenpuffer (s. Kapitel 2.9) abgestoppt. Wenn DNA verdaut wurde, die mittels alkalischer Lyse präpariert worden war, enthielt der DNA-Probenpuffer 0,5 mg/ml RNase A.

2.1.5 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden zu analytischen und präparativen Zwecken in Agarosegelen aufgetrennt. Die Agarosekonzentration der Gele richtete sich nach der Fragmentgröße und lag in der Regel zwischen 1-1,5% (w/v). Die Agarose wurde unter Erhitzen in TAE-Puffer (s. Kapitel 2.9) gelöst und mit 1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt, um eine UV-Detektion der DNA zu ermöglichen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 90 V. Zu präparativen Zwecken wurde die gewünschte DNA aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Gel Extraction Kit (Pqclab) nach den Angaben des Herstellers präpariert.

2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die kovalente Insertion eines DNA-Fragments in einen Vektor wurde die T4-DNA-Ligase (s. Kapitel 2.7) benutzt. DNA-Fragmente wurden mittels PCR (s. Kapitel 2.1.3) hergestellt und durch Restriktionsverdau (s. Kapitel 2.1.4) mit den für die Ligation gewünschten Molekülen ausgestattet. Vektor-DNA wurde aus *E. coli* präpariert (s. Kapitel 2.1.1) und ebenfalls durch Restriktionsverdau (s. Kapitel 2.1.4) mit den für die Ligation gewünschten Molekülen ausgestattet. Pro Ligationsansatz wurden 1,5 U T4-DNA-Ligase, 1 µl Vektor-DNA und 5-10 µl DNA-Fragment verwendet. Die Ligation wurde über Nacht bei 15°C mit dem vom Hersteller empfohlenen Ligationspuffer (s. Kapitel 2.9) durchgeführt.

2.1.7 Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen

Rekombinante DNA wurde in zwei verschiedenen *E.coli*-Stämmen (XL1-blue und DH5α, s. Kapitel 2.12) kloniert. Beide Stämme wurden zur Aufnahme von DNA (s. Kapitel 2.1.8) chemisch kompetent gemacht. Dazu die Zellen in 400 ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von ca. 0,4 erreicht war.

Bevor die Zellen geerntet wurden (10 min, 2.000 g, 4°C), wurden sie 5 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde das Zellpellet in 50 ml sterilem Kompetenzmedium I (s. Kapitel 2.9) aufgenommen und auf Eis inkubiert. Nach 20 min wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (10 min, 2.000 g, 4°C) und in 1,5 ml sterilem Kompetenzmedium II (s. Kapitel 2.9) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Aliquots von 90 µl bei -80°C gelagert.

2.1.8 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von *E.coli*-Zellen wurden 90 µl kompetente Zellen (s. Kapitel 2.1.7) mit 10 µl Ligationsansatz (s. Kapitel 2.1.6) oder 2 µl präparierter Plasmid-DNA (s. Kapitel 2.1.1) 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte für 2 min eine Inkubation bei 42°C (Hitzeschock). Danach wurden die Zellen auf Eis gekühlt und in 1 ml sterilem LB-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 1h bei 37°C geschüttelt und dann auf LB-Platten mit geeigneten Selektionsmarkern ausgestrichen (100 µl Zellsuspension pro Platte). Nach einer Inkubation von ca. 12-18 h bei 37°C wurden Klone von den Platten gepickt.

2.1.9 Klonierung von verwendeten Konstrukten

Für diese Arbeit wurden verschiedene Plasmide kloniert und verwendet. Tabelle 2.1 zeigt die Plasmide, die zur Proteinexpression in *E.coli* und in Retikulozytenlysate verwendet wurden. Plasmide, die zur Proteinexpression in Hefe verwendet wurden, sind in Kapitel 2.2.1 (Tabelle 2.2) aufgelistet. Die folgenden Unterkapitel geben einen Überblick über die jeweiligen Klonierungsstrategien.

Tabelle 2.1: Verwendete Plasmide

Plasmid	Plasmidmarker	Exprimiertes Protein	Bemerkung	Expressionssystem	Referenz
pQE32	<i>amp</i>	N-His-Rip1 ₃₁₋₂₁₅	---	<i>E. coli</i> (XL1Blue)	Wagener et al., 2011
pQE32	<i>amp</i>	N-His-Rip1 ₆₁₋₂₁₅	---	<i>E. coli</i> (XL1Blue)	Wagener et al., 2011
pQE32	<i>amp</i>	N-His-Rip1 ₉₁₋₂₁₅	---	<i>E. coli</i> (XL1Blue)	Wagener et al., 2011

pQE32	<i>amp</i>	N-His-Rip1-A- <i>stretch</i>	N-His- Rip1 ₃₁₋₂₁₅ wobei die Aminosäur en 172-179 durch Alaninreste ersetzt sind	<i>E. coli</i> (XL1Blue)	Wagener et al., 2011
pQE32	<i>amp</i>	N-His-Rip1 ₃₁₋₁₂₃	---	<i>E. coli</i> (XL1Blue)	Wagener et al., 2011
pQE32	<i>amp</i>	N-His-TEV- Rip1 ₃₁₋₂₁₅	---	<i>E. coli</i> (XL1Blue)	Diese Arbeit
pQE32	<i>amp</i>	N-His-TEV- Rip1 ₆₁₋₂₁₅	---	<i>E. coli</i> (XL1Blue)	Diese Arbeit
pQE32	<i>amp</i>	N-His-TEV- Rip1 ₉₁₋₂₁₅	---	<i>E. coli</i> (XL1Blue)	Diese Arbeit
pQE32	<i>amp</i>	N-His-TEV-Rip1- <i>A-stretch</i>	N-His-TEV- Rip1 ₃₁₋₂₁₅ wobei die Aminosäur en 172-179 durch Alaninreste ersetzt sind	<i>E. coli</i> (XL1Blue)	Diese Arbeit
pQE32	<i>amp</i>	N-His-TEV- Rip1 ₃₁₋₁₂₃	---	<i>E. coli</i> (XL1Blue)	Diese Arbeit
p793 + pRIL	<i>amp + chlor</i>	His- TEV(S219V)-Arg	---	<i>E. coli</i> (BL21 (DE3)-RIL)	addgene; article: Kapust RB et al., 2001 14(12): 993- 1000
pGEM4	<i>amp</i>	Rip1 ₁₋₂₁₅	---	Retikulozytenlysats	Wagener et al., 2011
pGEM4	<i>amp</i>	Rip1 Δ 31-60	---	Retikulozytenlysats	Wagener et al., 2011
pGEM4	<i>amp</i>	Rip1 Δ 31-90	---	Retikulozytenlysats	Wagener et al., 2011
pGEM4	<i>amp</i>	Rip1-A- <i>stretch</i>	Rip1 ₃₁₋₂₁₅ wobei die Aminosäur en 172-179 durch Alaninreste ersetzt sind	Retikulozytenlysats	Wagener et al., 2011
pGEM4	<i>amp</i>	Rip1 ₁₋₁₂₃	---	Retikulozytenlysats	Wagener et al., 2011

2.1.9.1 Klonierung von pRS426-Rip1-Varianten

Zur Expression von Rip1-Varianten mit kurzen C-terminalen Deletionen in Hefe (Δ rip1-Hintergrund) wurden mittels PCR (s. Kapitel 2.1.3) erzeugte Promotor-*RIP1*-Terminator-Fragmente in einen pRS426-Vektor eingefügt. Als Matrize diente ein pRS426-Plasmid, das die vollständige kodierende *RIP1*-Sequenz (RIP1/YEL024W, Chromosome V, Koordinaten 107260 to 107907) enthielt und von Sequenzbereichen flankiert war, die in der genomischen Sequenz 300 Basenpaare vor bzw. 200 Basenpaare nach der kodierenden Sequenz liegen (hergestellt von S. Funes, Wagener et al., 2011). Es wurden folgende Primer verwendet:

Rip1-Variante	Schnittstelle	Sequenz (bindende Sequenz grau hervorgehoben)
Forward Primer		
Alle	BamHI	5'-GGG <u>GAT CCC</u> TTT CAG GTT CGT CCA TAG-3'
Reverse Primer		
Rip1 ₁₋₂₀₀	HindIII	5'-GGG <u>AAG CTT</u> CTA TAA TTC TAA GTT TAA GGG GGC AGG-3'
Rip1 ₁₋₂₀₁	HindIII	5'-GGG <u>AAG CTT</u> CTA TTC TAA GTT TAA GGG GGC AGG TCC-3'
Rip1 ₁₋₂₀₃	HindIII	5'-GGG <u>AAG CTT</u> CTA AGG AAT TTC TAA GTT TAA GGG GGC-3'
Rip1 ₁₋₂₀₅	HindIII	5'-GGG <u>AAG CTT</u> CTA ATA AGC AGG AAT TTC TAA GTT TAA-3'
Rip1 ₁₋₂₀₇	HindIII	5'-GGG <u>AAG CTT</u> CTA GAA TTC ATA AGC AGG AAT TTC TAA-3'
Rip1 ₁₋₂₀₉	HindIII	5'-GGG <u>AAG CTT</u> CTA ACC ATC GAA TTC ATA AGC AGG AAT-3'
Rip1 ₁₋₂₁₀	HindIII	5'-GGG <u>AAG CTT</u> CTA ATC ACC ATC GAA TTC ATA AGC AGG-3'
Rip1 ₁₋₂₁₁	HindIII	5'-GGG <u>AAG CTT</u> CTA CTT ATC ACC ATC GAA TTC ATA AGC-3'
Rip1 ₁₋₂₁₄	HindIII	5'-GGG <u>AAG CTT</u> CTA AAC AAT GAC CTT ATC ACC ATC G-3'
Rip1 ₁₋₂₁₅	HindIII	5'-GGG <u>AAG CTT</u> CTA ACC AAC AAT GAC CTT ATC ACC ATC G-3'

Die Promotor-*RIP1*-Fragmente wurden mit BamHI und HindIII verdaut und, wie in Kapitel 2.1.6 beschrieben, in einen in gleicher Weise verdauten pRS426-Vektor eingefügt. Nach Transformation in DH5 α -Zellen (s. Kapitel 2.1.8) wurde das Plasmid mithilfe eines positiven Klon vervielfacht und in großem Maßstab (s. Kapitel 2.1.1) präpariert. Das präparierte Plasmid wurde anschließend in Hefezellen transformiert (s. Kapitel 2.2.4).

Zur Herstellung von Konstrukten mit der genetischen Information für Rip1-Varianten mit längeren Deletionen oder Punktmutationen wurde der „Phusion* Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma ThermoScientific (s. Kapitel 2.8) verwendet. Als Matrize diente ein pRS426-Plasmid, das die vollständige kodierende *RIP1*-Sequenz enthielt (s.o.). Es wurden folgende Primer verwendet:

Rip1-Variante	Schnittstelle	Sequenz (bindende Sequenz grau hervorgehoben)
Forward Primer		
Rip1 Δ 31-60	---	5'-Pho- <u>GGT GCT ATG GGT CTT TTG TCA TCT GCA GG</u> -3'
Rip1 Δ 31-90	---	5'-Pho-ATG GCT AAA GTT GAA GTT AAT TTA GCG GC-3'
Rip1-A-stretch	NaeI	5'-GGG <u>GCC GGC</u> GCA GCG GCA GCG GCA GCG GCA GCG TGC CAT GGT TCA CAT TAT G-3'
Rip1 ₁₋₁₂₃	---	5'-Pho-TAG AAG CTT GGG TCT CCC TAT AGT GAG TCG-3'
Reverse Primer		
Rip1 Δ 31-60 und Rip1 Δ 31-90	---	5'-Pho-TTT GCT AGC CAG CAA AGA TTG AGA AAT CAG TC-3'
Rip1-A-stretch	NaeI	5'-GGG <u>GCC GGC</u> TTG ACC AAT TGG AAC ACA ACC-3'
Rip1 ₃₁₋₁₂₃	---	5'-Pho-AGG AGT TCT GTG TCT AAT GAA CAC AGG C-3'

Zur Herstellung des Konstrukts mit der genetischen Information für Rip1-A-stretch wurde das PCR-Produkt mit NaeI verdaut und anschließend ligiert (s. Kapitel 2.1.6).

2.1.9.2 Klonierung von pRS426-His-Rip1

Zur Expression einer Rip1-Variante mit einem N-terminalen His-Tag in Hefe (Δ rip1-Hintergrund) wurden mittels PCR (s. Kapitel 2.1.3) zwei *RIP1*-Fragmente hergestellt (s. Abb. 2.1), die später ligiert wurden (s. Kapitel 2.1.6).

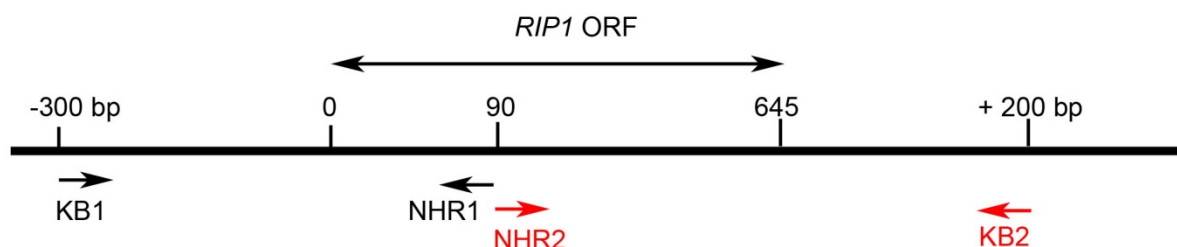


Abb. 2.1: Klonierungsstrategie für pRS426-His-Rip1

Da beim Import in Mitochondrien die ersten 30 Aminosäuren (entspricht Basenpaare 1-90) des Rip1-Vorläuferproteins abgespalten werden (s. Kapitel 1.1), musste der His-Tag vor Aminosäure 31 positioniert werden (entspricht Basenpaare 91-93). Das ligierte *RIP1*-Fragment wurde in einen pRS426-Vektor eingefügt. Als Matrize diente ein pRS426-Plasmid,

das die vollständige kodierende *RIP1*-Sequenz enthielt. Flankiert war die *RIP1*-Sequenz von Sequenzen (jeweils ca. 300 bp), die in der genomischen Sequenz vor bzw. nach der kodierenden Sequenz liegen (hergestellt von S. Funes, Wagener et al., 2011). Es wurden folgende Primer verwendet:

Primer	Schnittstelle	Sequenz (bindende Sequenz grau hervorgehoben)
Forward Primer		
KB1	BamHI	5'-GGG <u>GAT CCC</u> TTT CAG GTT CGT CCA TAG-3'
NHR1	XmaI	5'-GCG <u>CCC GGG</u> CAT CAC CAT CAC CAT CAC AAA TCC ACG TAC AGG ACC CC-3'
Reverse Primer		
NHR2	XmaI	5'-GCG <u>CCC GGG</u> GCT AGC CAG CAA AGA TTG AGA AAT CAG-3'
KB2	XhoI	5'-GGC <u>TCG AGT</u> AGT GAT TTT CGT TCC TTT TTG-3'

Die *RIP1*-Fragmente wurden mit BamHI und XmaI bzw. XmaI und XhoI verdaut und, wie in Kapitel 2.1.6 beschrieben, in einen mit BamHI und XhoI verdauten pRS426-Vektor eingefügt. Nach Transformation in DH5 α -Zellen (s. Kapitel 2.1.8) wurde das Plasmid mithilfe eines positiven Klons vervielfacht und in großem Maßstab (s. Kapitel 2.1.1) präpariert. Das präparierte Plasmid wurde anschließend in Hefezellen transformiert.

2.1.9.3 Klonierung von pYep51vk-His-Bcs1(E319Q)

Zur Herstellung eines Konstrukts mit der genetischen Information für eine Bcs1-Variante mit der Punktmutation E319Q wurde der „Phusion* Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma ThermoScientific (s. Kapitel 2.8) verwendet. Als Matrize für die Mutagenese-PCR (s. Kapitel 2.1.3) diente das pYep51vk-His-Bcs1-Plasmid (s. Kapitel 2.2.1 Tabelle 2.2). Es wurden folgende Primer verwendet:

Sequenz (bindende Sequenz grau hervorgehoben)
Forward Primer
5'-Pho-GGA GCA TAC TAT TAC TGC AGG ATA TTG ACG CGG-3'
Reverse Primer
5'-Pho-CCG CGT CAA TAT CCT GCA GTA ATA GTA TGC TCC-3'

2.1.9.4 Klonierung von pGEM4-Rip1-Varianten

Die Klonierung von pGEM4-Konstrukten mit der genetischen Information für der Rip1-Varianten Rip1 Δ 31-60, Rip1 Δ 31-90, Rip1-A-stretch und Rip1₁₋₁₂₃ wurde mit dem „Phusion“ Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma ThermoScientific durchgeführt. Dabei wurden die Primer verwendet, die in Kapitel 2.1.9.1 aufgelistet sind.

2.1.9.5 Klonierung von pQE32-His-Rip1-Varianten

Zur Herstellung von Konstrukten mit der genetischen Information für Rip1-Varianten zur Expression in *E. coli* (XL1-blue) wurde der „Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene verwendet. Als Matrize diente ein pRS426-Plasmid, das die vollständige kodierende *RIP1*-Sequenz enthielt (s.o.). Es wurden folgende Primer verwendet:

Rip1-Variante	Schnittstelle	Sequenz (bindende Sequenz grau hervorgehoben)
Forward Primer		
Rip1 ₃₁₋₂₁₅	Xmal	5'-GCG <u>CCC GGG</u> ATG TTA GGA ATA AGA TCA TCT GTC AAG ACC-3'
Rip1 ₆₁₋₂₁₅	Xmal	5'-GCG <u>CCC GGG</u> GGT GCT ATG GGT CTT TTG TCA TCT GC-3'
Rip1 ₉₁₋₂₁₅	Xmal	5'-GCG <u>CCC GGG</u> ATG GCT AAA GTT AAT TTA GC-3'
Rip1-A-stretch	NaeI	5'-GGG <u>GCC GGC</u> GCA GCG GCA GCG GCA GCG GCA GCG TGC CAT GGT TCA CAT TAT G-3'
Reverse Primer		
Rip1 ₃₁₋₂₁₅ , Rip1 ₆₁₋₂₁₅ , Rip1 ₉₁₋₂₁₅ ,	HindIII	5'-GGG <u>CTC GAG</u> CTA ACC AAC AAT GAC CTT ATC ACC-3'
Rip1 ₃₁₋₁₂₃	HindIII	5'-GGG <u>AAG CTT</u> CTA AGG AGT TCT GTG TCT AAT GAA CAC-3'
Rip1-A-stretch	NaeI	5'-GGG <u>GCC GGC</u> TTG ACC AAT TGG AAC ACA ACC-3'

Die *RIP1*-Fragmente wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen verdaut und wie in Kapitel 2.1.6 beschrieben in einen in gleicher Weise verdauten pRS426-Vektor eingefügt. Zur Herstellung des Konstrukts mit der genetischen Information für Rip1-A-stretch wurde das

PCR-Produkt mit NaeI verdaut und anschließend ligiert (s. Kapitel 2.1.6). Nach Transformation in XL1-blue-Zellen (s. Kapitel 2.1.8) konnten die Rip1-Varianten aus den entsprechenden Transformanten gewonnen werden (s. Kapitel 2.4.3).

2.1.9.6 Klonierung von pQE32-His-TEV-Rip1-Varianten

Zur Expression von Rip1-Varianten in *E. coli* (XL1-blue) wurden mittels PCR (s. Kapitel 2.1.3) erzeugte Promotor-*RIP1*-Fragmente in einen pQE32-Vektor eingefügt. Als Matrize diente ein pRS426-Plasmid, das die vollständige kodierende *RIP1*-Sequenz enthielt. Flankiert war die *RIP1*-Sequenz von Sequenzen (ca. 300 bp bzw. 200 bp), die in der genomischen Sequenz vor bzw. nach der kodierenden Sequenz liegen (hergestellt von S. Funes, Wagener et al., 2011). Im Fall von Rip1-A-stretch diente pQE30-Rip1-A-stretch (hergestellt von N. Wagener, Wagener et al., 2011) als Matrize. Es wurden folgende Primer verwendet:

Rip1-Variante	Schnittstelle	Sequenz (bindende Sequenz grau hervorgehoben)
Forward Primer		
Rip1 ₃₁₋₂₁₅ , Rip1 ₃₁₋₁₂₃ , Rip1-A-stretch	XmaI	5'- <u>CCC GGG</u> TCA GAG AAT CTT TAT TTT CAG GGA AAA TCC ACG TAC AGG ACC CCA AAT TTT G-3'
Rip1 ₆₁₋₂₁₅	XmaI	5'- <u>CCC GGG</u> TCA GAG AAT CTT TAT TTT CAG GGA GGT GCT ATG GGT CTT TTG TCA-3'
Rip1 ₉₁₋₂₁₅	XmaI	5'- <u>CCC GGG</u> TCA GAG AAT CTT TAT TTT CAG GGA ATG GCT AAA GTT GAA GTT AAT TTA GC-3'
Reverse Primer		
Rip1 ₃₁₋₂₁₅ , Rip1 ₆₁₋₂₁₅ , Rip1 ₉₁₋₂₁₅ ,	HindIII	5'-GGG <u>CTC GAG</u> CTA ACC AAC AAT GAC CTT ATC ACC-3'
Rip1 ₃₁₋₁₂₃	HindIII	5'-GGG <u>AAG CTT</u> CTA AGG AGT TCT GTG TCT AAT GAA CAC-3'

Die *RIP1*-Fragmente wurden mit HindIII und XmaI verdaut und wie in Kapitel 2.1.6 beschrieben in einen in gleicher Weise verdauten pQE32-Vektor eingefügt. Nach Transformation in XL1-blue-Zellen (s. Kapitel 2.1.8) konnten die Rip1-Varianten aus den entsprechenden Transformanten gewonnen werden (s. Kapitel 2.4.3).

2.2 Methoden der Hefekultur und – genetik

2.2.1 Verwendete Hefestämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Wildtypstamm W303 (*MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15*) verwendet (Rothstein, 1983). Ausgehend von diesem Stamm wurden verschiedene Hefestämme hergestellt (s. Tabelle 2.2). Angaben zur Herstellung dieser Stämme finden sich in Kapitel 2.2.5.

Tabelle 2.2: Hefestämme

Deletion	Genotyp	Plasmid (Marker)	Episomal exprimiertes Protein	Promotor	Referenz
$\Delta bcs1$	<i>BCS1::HIS3</i>	---	---	---	Cruciat et al., 1999
$\Delta bcs1$	<i>BCS1::HIS3</i>	pYep51vk (Leu2)	N-His-Bcs1	Gal10	Erhalten von Kai Hell
$\Delta bcs1$	<i>BCS1::HIS3</i>	pYep51vk (Leu2)	N-His- Bcs1(E319)	Gal10	Diese Arbeit
$\Delta bcs1$	<i>BCS1::HIS3</i>	pYep51vk (Leu2)	N Δ 40Bcs1- His	Gal10	Dissertation Heike Fölsch
$\Delta bcs1$	<i>BCS1::HIS3</i>	pYep51vk (Leu2)	N Δ 65Bcs1- His	Gal10	Dissertation Heike Fölsch
$\Delta bcs1$	<i>BCS1::HIS3</i>	pYep51vk (Leu2)	N Δ 82Bcs1- His	Gal10	Dissertation Heike Fölsch
$\Delta bcs1$ $\Delta rip1$	<i>BCS1::HIS3</i> <i>RIP1::LEU2</i>	---	---	---	Diese Arbeit
$\Delta cyt1$	<i>CYT1::HIS3</i>	---	---	---	Cruciat et al., 1999

<i>Δrip1</i>	<i>RIP1::LEU2</i>	---	---	---	Cruciat et al., 1999
<i>Δrip1</i>	<i>RIP1::LEU2</i>	pRS426 (Ura3)	Rip1 ₁₋₂₁₅	endogen	Diese Arbeit
<i>Δrip1</i>	<i>RIP1::LEU2</i>	pRS426 (Ura3)	Rip1 ₁₋₂₁₄	endogen	Diese Arbeit
<i>Δrip1</i>	<i>RIP1::LEU2</i>	pRS426 (Ura3)	Rip1 ₁₋₂₁₁	endogen	Diese Arbeit
<i>Δrip1</i>	<i>RIP1::LEU2</i>	pRS426 (Ura3)	Rip1 ₁₋₂₀₉	endogen	Diese Arbeit
<i>Δrip1</i>	<i>RIP1::LEU2</i>	pRS426 (Ura3)	Rip1 ₁₋₂₀₅	endogen	Diese Arbeit
<i>Δrip1</i>	<i>RIP1::LEU2</i>	pRS426 (Ura3)	Rip1 ₁₋₂₀₀	endogen	Diese Arbeit
<i>Δrip1</i>	<i>RIP1::LEU2</i>	pRS426 (Ura3)	Rip1Δ31-60	endogen	N. Wagener
<i>Δrip1</i>	<i>RIP1::LEU2</i>	pRS426 (Ura3)	Rip1Δ31-90	endogen	N. Wagener
<i>Δrip1</i>	<i>RIP1::LEU2</i>	pRS426 (Ura3)	Rip1-A- <i>stretch</i>	endogen	N. Wagener
<i>Δrip1</i>	<i>RIP1::LEU2</i>	pRS426 (Ura3)	Rip1 ₁₋₁₂₃	endogen	N. Wagener
<i>Δrip1</i>	<i>RIP1::LEU2</i>	pRS426 (Ura3)	His-Rip1	endogen	Diese Arbeit

2.2.2 Kultur von *S. cerevisiae*

Zur Kultivierung von *S. cerevisiae* kamen verschiedene Voll- bzw. Selektivmedien zum Einsatz, die in Tabelle 2.3 zusammengefasst sind. Im Allgemeinen erfolgte die Anzucht bei 30°C, für Wachstumstests wurde aber auch bei 24°C und 37°C gearbeitet. Je nach Stamm und experimenteller Zielsetzung wurden Glukose, Galaktose, Glyzerin oder Laktat als Kohlenstoffquelle bereitgestellt. Falls auxotrophe Mutanten selektiert werden sollten, wurde das jeweils geeignete Selektivmedium (s. Tabelle 2.3) verwendet.

Hefestämme wurden in 15% (v/v) Glyzerin bei -80°C gelagert und bei Bedarf auf geeignete Platten ausgestrichen. Nach einer Inkubationszeit von ca. zwei Tagen bei 30°C konnten diese Platten zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendet werden. Flüssigkulturen wurden in regelmäßigen Abständen verdünnt, um die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ 0,1-1,2) zu halten.

Tabelle 2.3: Medien für die Hefezucht

Vollmedien	
YP-Medium	10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Bacto-Pepton, pH 5,5 (HCl); nach dem Autoklavieren wurde die gewünschte Kohlenstoffquelle hinzugefügt: - 2% (w/v) Glukose (D) - 2% (w/v) Galaktose (Gal) - 3% (w/v) Glyzerin (G)
Laktat-Medium	3 g/l Hefeextrakt, 1 g/l K ₂ HPO ₄ , 1g/l NH ₄ Cl, 0,5 g/l CaCl ₂ , 0,5 g/l NaCl, 0,6 g/l MgSO ₄ , 0,3 ml/l 1% (w/v) FeCl ₃ , 2% (v/v) Laktat, pH 5,5 (KOH)
Selektivmedium	
Selektionsmarker	Adenin (20 mg/ ml), Urazil (20 mg/ ml), Histidin (20 mg/ ml), Lysin (30 mg/ ml), Leucin (30 mg/ ml), Tryptophan (20 mg/ ml)
Kohlenstoffquellen	Glukose (D) oder Galaktose (Gal): je 2% (w/v)
Sonstige Bestandteile	0,17% (w/v) Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren), 0,5% (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄

2.2.3 Bestimmung von Wachstumsphänotypen in *S. cerevisiae*

2.2.3.1 Bestimmung des Wachstums in Flüssigkultur

Um Wachstumsphänotypen zu analysieren wurden die entsprechenden Hefestämme in YP- oder Selektivmedium (s. Tabelle 2.3) angezogen. Die Medien wurden mit der Kohlenstoffquelle versetzt, die für die jeweilige Fragestellung relevant war.

Die Zellen wurden in einem Volumen von 25 ml kultiviert und durch geeignete Verdünnungen in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten. Die Verdoppelungszeit t_d wurde anhand folgender Formel bestimmt:

$$t_d = \frac{\ln(2) \cdot \Delta t}{\ln\left(\frac{OD_{Ende}}{OD_{Anfang}}\right)}$$

Hier steht Δt für das Zeitintervall der Anzucht, OD_{Ende} und OD_{Anfang} für die optischen Dichten (OD_{600}) zu Beginn und Ende dieses Intervalls. Die optischen Dichten wurden in konstanten Abständen von 2h gemessen.

2.2.3.2 Bestimmung des Wachstums auf festen Medien (Tüpfeltest)

Vor einem Tüpfeltest wurden die zu untersuchenden Hefestämme bei 30°C angezogen und über zwei Tage in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten. Die Zellen wurden schließlich bei einer OD_{600} von 0,6-0,8 geerntet, in Wasser gewaschen und danach wiederum in Wasser aufgenommen ($OD_{600} = 0,5/\text{ml}$). Aus der hergestellten Zellsuspension wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, bei der jede neue Verdünnung zehnmal weniger konzentriert war als die Ausgangssuspension. Für jede Verdünnung wurden 3,5 μl auf Selektivplatten aufgetragen, die dann bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert wurden.

2.2.4 Transformation von *S. cerevisiae*

Für die Transformation wurden Hefezellen verwendet, die über Nacht bei 30°C in geeignetem Medium angezogen, morgens verdünnt und schließlich bei einer OD_{600} von ca. 0,5 geerntet (5 min, 5.000 g, RT) wurden. Die Zellen wurden in Wasser gewaschen und für 10 min bei einer Temperatur von 30°C in 0,1 M Lithiumacetat vorinkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min, 5.000 g, RT) wurde der Überstand sorgfältig entfernt und das Zellpellet wurde mit 240 μl 50% (w/v) Polyethylenglycol-3350, 36 μl 1 M Lithiumacetat, 5 μl 10 mg/ml Einzelstrang-DNA (hitzenaturierte Lachsspermien-DNA), 5 μl Plasmid-DNA bzw. 50 μl aufgereinigtem PCR-Ansatz (s. Kapitel 2.1.3 und 2.1.5) und 74 μl bzw. 29 μl Wasser überschichtet. Durch Vortexen (1 min) wurden die Zellen in Suspension gebracht und anschließend für 45 min bei 42°C unter leichtem Schütteln in dem beschriebenen Ansatz bebrütet. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 5.000 g, RT), in 100 μl Wasser aufgenommen und auf Selektivplatten (s. Kapitel 2.2.2) ausgestrichen. Entstehende Kolonien wurden vereinzelt, weiter angezogen und mittels Schnell-Mitochondrienpräparation (s. Kapitel 2.3.1) analysiert.

2.2.5 Herstellung von Deletionsstämmen

Für diese Arbeit wurden folgende Deletionsstämme durch homologe Rekombination vervielfachter DNA-Fragmente (s. Kapitel 2.1.3) mit chromosomaler DNA hergestellt:

$\Delta bcs1 \Delta rip1$

Das für die homologe Rekombination eingesetzte DNA-Fragment wurde an einer Matrize aus genomischer DNA (s. Kapitel 2.1.2), die aus einem *$\Delta rip1$* -Stamm (s. Tabelle 2.2) isoliert wurde, amplifiziert. Dabei wurden folgende Primer verwendet

5'-ACA TAA ATA ATA TCA CTC TAA CAC TTA TTA GG-3'

5'-GGG TGA AAC AAA TAG ACA ATA AAG ATG TAG-3'

Vervielfachte DNA-Fragmente wurden gereinigt und in den *$\Delta bcs1$* -Stamm (s. Tabelle 2.2) transformiert (s. Kapitel 2.2.4).

2.3 Zellbiologische Untersuchungsmethoden

2.3.1 Schnell-Mitochondrienpräparation

Hefezellen wurden über Nacht bei 30°C angezogen und am folgenden Morgen durch Zentrifugation (5 min, 5.000g, RT) geerntet. Die Zellen wurden auf Eis in 300 µl SH/KCl (s. Kapitel 2.9) aufgenommen, das 2 mM PMSF zum Schutz vor proteolytischem Abbau enthielt. Anschließend wurden die Zellwände mithilfe von gekühlten Glasperlen (Durchmesser 0,5 mm) aufgebrochen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen zusammen mit den Glasperlen viermal 30s auf dem Vortex-Gerät gemischt. In den Pausen wurden die Zellen auf Eis gelagert. Im Anschluss wurden Zelltrümmer und Membranreste durch einen Zentrifugationsschritt (3 min, 1.000g, 4°C) abgetrennt. Aus dem Überstand wurde eine mit Mitochondrien angereicherte Fraktion durch Zentrifugation (10 min, 19.000g, 4°C) gewonnen.

2.3.2 Mitochondrienpräparation

Hefezellen wurden über Nacht in Flüssigkultur bis zu einer OD_{600} von 0,8 bis 1,2 angezogen. Zum Ernten wurden die Zellen für 5 min bei Raumtemperatur und 4.000 rpm (JA10-Rotor) abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in Wasser gewaschen, in MP1-Puffer (s. Kapitel 2.9) resuspendiert und für 10 min bei der Anzuchttemperatur (i.d.R. 30°C) inkubiert. Danach wurden die Zellen pelletiert (5 min, 3.300 rpm, JA10-Rotor, RT) und mit 1,2 M Sorbitol gewaschen. Zum Verdau der Zellwände wurde das Zellpellet schließlich in MP2-Puffer (s. Kapitel 2.9, 6,7 ml/g Frischgewicht) aufgenommen und mit 3 mg/g Frischgewicht Zymolyase (s. Kapitel 2.7) versetzt. Nach 30 bis 60 min bei 30°C (oder der jeweiligen Anzuchttemperatur) wurden die erzeugten Sphäroplasten sedimentiert (5 min, 2.500 rpm, JA10-Rotor, 2°C) und in eisgekühltem MP3-Puffer (s. Kapitel 2.9, 6,7 ml/g Frischgewicht) resuspendiert. Die Suspension wurde zehnmal auf Eis mit Potter und Pistill homogenisiert, mit MP3-Puffer verdünnt (13,4 ml/ g Frischgewicht) und zweimal abzentrifugiert (3.300 rpm, JA10-Rotor, 5 min, 2°C), um Zelltrümmer zu entfernen. Danach wurde aus dem Homogenisat mittels Zentrifugation (12 min, 10.000 rpm, JA10-Rotor, 2°C) eine mitochondriale Fraktion angereichert, die in 10 ml SH-Puffer (s. Kapitel 2.9) aufgenommen wurde. Die erhaltene Suspension wurde abzentrifugiert (5 min, 4.000 rpm, JA20-Rotor, 2°C) und aus dem Überstand wurde die mitochondriale Fraktion angereichert (12 min, 12.000 rpm, JA20-Rotor, 2°C). Die so isolierten Mitochondrien wurden in SH-Puffer (s. Kapitel 2.9) resuspendiert (Endkonzentration 10 mg mitochondriales Protein/ ml SH) und in Aliquots von 30-600 µl bei -80°C gelagert.

2.3.3 Untersuchungen zur Protease-Sensitivität

Um mitochondriale Proteine hinsichtlich ihrer Sensitivität für Proteasebehandlung zu testen, wurden verschiedene mitochondriale Subkompartimente zugänglich gemacht. Der Intermembranraum wurde durch Schwellen der Außenmembran nach hypotonem Schock, die Matrix durch Beschallung und/oder Behandlung mit Detergenzien zugänglich gemacht. Als Protease wurde Proteinase K (s. Kapitel 2.7) in einer Konzentration von 1 mg/ 3ml eingesetzt. Die Proteolyse wurde auf Eis durchgeführt und nach 10 min mit 2 mM PMSF gestoppt.

Zur Erzeugung von Mitoplasten wurden isolierte Mitochondrien (s. Kapitel 2.3.2) pelletiert (10 min, 19.000g, 4°C) und in hypotonem Puffer (20 mM Hepes/KOH pH 7,4) resuspendiert (Endkonzentration 1 mg/ml). Nach 30 min auf Eis, war der Intermembranraum in der Regel für Proteinase K zugänglich. Bei Mitochondrien aus mutanten Hefestämmen waren teilweise

Abweichungen möglich. Sollten Proteine in der Matrix zugänglich gemacht werden, wurden die Mitoplasten für 10-20 min unter Eiskühlung im Ultraschallbad behandelt, bis die Suspension klar war. Zusätzlich wurden die Proben teilweise mit SDS versetzt (15-75 mg SDS/ 0,6 mg mitochondriales Protein).

Zur Analyse wurden SDS-Gelelektrophorese und Western Blots (s. Kapitel 2.4.9 und 2.4.10) durchgeführt.

2.3.4 Import radiokativ markierter Proteine in isolierte Mitochondrien

Für den *in vitro*-Import wurden radiokativ markierte Vorläuferproteine (s. Kapitel 2.4.8) und isolierte Mitochondrien (s. Kapitel 2.3.2) verwendet. Die Mitochondrien wurden in Importpuffer (s. Kapitel 2.9) aufgenommen (Endkonzentration 0,75 mg/ ml), der bereits 2 mM ATP, 4 mM NADH, 10 mM Kreatinphosphat, 100 µg/ml Kreatinkinase, 2,5 mM Malat und 2,5 mM Succinat enthielt. Vor Zugabe des Vorläuferproteins wurde die Suspension für 5 min bei 25°C bzw. 15°C bebrütet. Die Importreaktion wurde durch Zugabe des radioaktiv markierten Proteins gestartet. Zu diesem Zweck wurden in der Regel 3% (v/v) des Retikulozytenlysats (je nach Stärke des radioaktiven Signals konnte die Menge variieren) mit dem markierten Protein (s. Kapitel 2.4.8) zugegeben. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots aus dem Reaktionsansatz entnommen und mit eisgekühltem SH-Puffer (s. Kapitel 2.9) verdünnt (Verdünnungsfaktor 6). Anschließend wurde Proteinase K (50 µg/ ml) zugegeben, um nicht-importierte Proteine zu verdauen. Nach 20 min wurde der Verdau mit 2 mM PMSF beendet. Die Mitochondrien wurden dann abzentrifugiert (10 min, 19.000g, 4°C) und mit SH/KCl-Puffer (s. Kapitel 2.9) gewaschen. Danach wurden die Mitochondrien erneut sedimentiert (10 min, 19.000g, 4°C) und mittels Gelelektrophorese (Kapitel 2.4.9 und 2.4.10) analysiert. Pro Gelspur wurden in der Regel 140 µg mitochondriales Protein und 2,85 µg als Gesamtfraction (Total) aufgetragen.

2.4 Proteinchemische Untersuchungsmethoden

2.4.1 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure

Zur Ausfällung von Proteinen aus wässrigen Lösungen wurde Trichloressigsäure verwendet. Diese wurde in einer Konzentration von 18% (w/v) eingesetzt und für 30 min auf Eis appliziert. Im Anschluss wurden die mit Trichloressigsäure behandelten Proben für mindestens 45 min bei 30.000g und 4°C zentrifugiert. Das entstehende Pellet wurde mit gekühltem Aceton gewaschen und erneut abzentrifugiert (25 min, 30.000g, 4°C). Schließlich wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in 1 x Laemmli-Puffer (s. Kapitel 2.9) aufgenommen.

2.4.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt und mithilfe einer Eichkurve quantifiziert, für die Standards aus Immunglobulinen verwendet wurden. Die zu bestimmenden Proben wurden 15 min bei Raumtemperatur mit dem Bradfordreagenz der Firma Biorad (s. Kapitel 2.6) inkubiert. Das Reagenz wurde zuvor 1 : 5 mit Wasser verdünnt. Die Proteinkonzentration wurde dann anhand der Absorption bei 595 nm bestimmt.

2.4.3 Expression und Anreicherung rekombinanter Proteine

2.4.3.1 Anreicherung von His₆-markiertem Rip1-Varianten

Zur Expression rekombinanter Rip1-Varianten wurden die Plasmide mit der entsprechenden genetischen Information (s. Kapitel 2.1.9) in kompetente *E.coli*-Zellen (XL1 blue) eingeschleust (s. Kapitel 2.1.8). Positive Transformanten wurden selektiert, um schließlich einen Klon für die weiteren Schritte auszuwählen.

Am Vortag der Anreicherung wurde eine Übernachtskultur des gewünschten Klons in 10 ml LB_{Amp} (s. Kapitel 2.9) angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bebrütet. Am folgenden Tag wurde die Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,06 verdünnt und weiter inkubiert, bis die Zellen eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht hatten. Dann wurde die Expression der gewünschten Proteine durch 2 mM IPTG induziert. Im Anschluss wurden die Kulturen für 2-3 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bevor die Zellen geerntet wurden (10 min, 4.500g, RT). Das Zellpellet wurde zunächst bei -20°C eingefroren, dann auf Eis aufgetaut und in 5 ml Puffer A (s. Kapitel 2.9) resuspendiert. Die Suspension wurde zehnmal für 10 s auf Eis beschallt (Branson Sonifier, Stufe 1, 35% Leistung) und schließlich für 15 min bei 17.400 g und 2°C zentrifugiert. Das

Pellet wurde verworfen und der Überstand wurde auf 2 ml Nickelnitrilotriacetat-Gelbett gegeben, das zuvor in Puffer A äquilibriert worden war. Dieser Ansatz wurde für 1-2 h bei 4°C inkubiert, wobei die Reaktionsgefäße mit konstanter Geschwindigkeit rotiert wurden. Danach wurde das Material als Säule gepackt und mit 10 Säulenvolumen Puffer A gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden schließlich in zehn Schritten mit je 0,5 ml Puffer B (s. Kapitel 2.9) eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden auf Eis gesammelt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.4.3.2 Anreicherung von His-TEV(S219V)-Arg

Das pRK793-Plasmid mit der genetischen Information für die Protease aus dem Tabakäztvirus (tobacco etch virus = TEV) mit der Mutation S219V wurde von der Firma addgene bezogen. Das Plasmid wurde in *E.coli*-Bakterien des Stammes BL21(De3)-RIL bereitgestellt. In diesen Bakterien führt es zur Überexpression der katalytischen Domäne der TEV-Protease, die mit dem Maltosebindeprotein fusioniert ist. Dieses Fusionsprotein führt *in vivo* eine Autoproteolyse durch, was zur Freisetzung der katalytischen Domäne führt. Diese Domäne trägt einen N-terminalen His-Tag (= His) und einen C-terminalen Polyarginin-Tag (= Arg).

Am Vortag der Anreicherung wurden die Bakterien in 10 ml LB_{Amp} (s. Kapitel 2.9) mit 30 µg/ml Chloramphenicol angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bebrütet. Am folgenden Tag wurde die Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,06 verdünnt und weiter bebrütet, bis die Zellen eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht hatten. Dann wurde die Expression durch 2 mM IPTG induziert. Im Anschluss wurde die Kultur für 5 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert, bevor die Zellen geerntet wurden (10 min, 4.500g, RT). Das Zellpellet wurde in 10 ml/g Feuchtgewicht Phosphatpuffer A₂ (s. Kapitel 2.9) resuspendiert und für 1h bei 4°C mit 1 mg/ml Lysozym behandelt. Die Suspension wurde zehnmal für 10 s auf Eis beschallt (Branson Sonifier, Stufe 1, 35% Leistung) und schließlich für 15 min bei 17.400 g und 2°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pumprate von 1ml/min bei 4°C auf eine Säule mit 3 ml Nickelnitrilotriacetat-Gelbett gegeben, das zuvor in Puffer A₂ äquilibriert worden war. Anschließend wurde die Säule mit 50 ml Phosphatpuffer A₂ gewaschen (Pumprate: 1ml/min) und schließlich mit 15 ml Phosphatpuffer B₂ (s. Kapitel 2.9) eluiert. Elutionsfraktionen von 0,5 ml wurden auf Eis gesammelt, mit 1 mM DTT und 1 mM EDTA versetzt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Um das Maltosebindeprotein abzutrennen, wurden die relevanten Fraktionen mittel Gelfiltration (Superdex75-Säule) gereinigt. Für die Gelfiltration wurde ein Puffer mit 10 mM DTT und 2 mM EDTA verwendet (s. Kapitel 2.9). Die gereinigten Fraktionen wurden mit 50% Glycerin versetzt und flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.4.3.3 Anreicherung des Bcs1-Antigens

Zur Expression des Bcs1-Antigens wurde das Plasmid (Dissertation Heike Fölsch) mit der entsprechenden genetischen Information (s. Kapitel 2.1.9) in kompetente *E.coli*-Zellen (XL1 blue) eingeschleust (s. Kapitel 2.1.8).

Am Vortag der Anreicherung wurde eine Übernachtskultur in 10 ml LB_{Amp} (s. Kapitel 2.9) angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bebrütet. Am folgenden Tag wurde die Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,06 verdünnt und weiter bebrütet, bis die Zellen eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht hatten. Dann wurde die Expression der gewünschten Proteine durch 2 mM IPTG induziert. Im Anschluss wurden die Kulturen für 2 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bevor die Zellen geerntet wurden (10 min, 4.500g, RT). Das Zellpellet wurde zunächst bei -20°C eingefroren, dann auf Eis aufgetaut und in 5 ml Puffer A (s. Kapitel 2.9) resuspendiert. Die Suspension wurde zehnmal für 10 s auf Eis beschallt (Branson Sonifier, Stufe 1, 35% Leistung) und schließlich für 15 min bei 17.400 g und 2°C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand wurde auf 2 ml Nickelnitrilotriacetat-Gelbett gegeben, das zuvor in Puffer A äquilibriert worden war. Dieser Ansatz wurde für 1-2 h bei 4°C inkubiert, wobei die Reaktionsgefäße mit konstanter Geschwindigkeit rotiert wurden. Danach wurde das Material als Säule gepackt und mit 10 Säulenvolumen Puffer A gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden schließlich in zehn Schritten mit je 0,5 ml Puffer B (s. Kapitel 2.9) eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden auf Eis gesammelt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.4.4 Expression und Anreicherung von Proteinen aus Hefe

Zur Expression rekombinanter Proteine wurden die Plasmide mit der entsprechenden genetischen Information (s. Kapitel 2.2.1) in Hefezellen eingeschleust (s. Kapitel 2.2.4). Positive Transformanten wurden selektiert, um schließlich einen Klon für die weiteren Schritte auszuwählen. Die Hefezellen wurden in geeignetem Medium (s. Kapitel 2.2.2) angezogen und bei einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 geerntet, um Mitochondrien zu isolieren (s. Kapitel 2.3.2).

2.4.4.1 Anreicherung von His-Bcs1

Mitochondrien mit His-getagtem Bcs1 (s. Kapitel 2.2.1) wurden sedimentiert (10 min, 19.000 g, 2°C) und in eisgekühltem Phosphatpuffer A (s. Kapitel 2.9) resuspendiert (Endkonzentration 10 mg mitochondriales Protein/ml). Anschließend wurden die Mitochondrien für 10 min auf Eis mit Digitonin (3 mg/ mg mitochondriales Protein) lysiert.

Im Anschluss wurden Membranfragmente abgetrennt (10 min, 10.000g, 2°C). Der Überstand wurde mit Nickelnitrilotriacetat (100 µl/500 µg mitochondriales Protein) versetzt und mit Phosphatpuffer A auf eine Endkonzentration von 4 mg mitochondriales Protein/ml eingestellt. Der Ansatz wurde 1h bei 4°C unter Taumeln inkubiert, dann dreimal in Phosphatpuffer A mit 0,1% (w/v) Digitonin gewaschen. Schließlich wurde His-Bcs1 auf Eis mit Phosphatpuffer B mit 0,1% (w/v) Digitonin eluiert (in der Regel 0,04 µl/ µg mitochondrialem Protein im Anreicherungsansatz).

2.4.4.2 Anreicherung von His-Rip1

Mitochondrien mit His-getaggtm Rip1 (s. Kapitel 2.2.1) wurden sedimentiert (10 min, 19.000g, 2°C) und in eisgekühltem Phosphatpuffer A (s. Kapitel 2.9) resuspendiert (Endkonzentration 9,4 mg mitochondriales Protein/ml). Anschließend wurden die Mitochondrien für 45 min auf Eis (oder bei 4°C unter Rotieren) mit Triton X-100 (1 mg/ mg mitochondriales Protein) und SDS (0,05 mg/ mg mitochondriales Protein) lysiert (Endkonzentration 9 mg mitochondriales Protein/ml). Im Anschluss wurden Membranfragmente abgetrennt (10 min, 10.000g, 2°C). Der Überstand wurde mit Nickelnitrilotriacetat (100 µl/500 µg mitochondriales Protein) versetzt und mit Phosphatpuffer A auf eine Endkonzentration von 4 mg mitochondriales Protein/ml eingestellt. Der Ansatz wurde 1h bei 4°C unter Taumeln inkubiert, dann dreimal in Phosphatpuffer A gewaschen. Schließlich wurde His-Bcs1 auf Eis mit Phosphatpuffer B mit 0,1% (w/v) Triton X-100 (22 µl/mg Ausgangsmaterial) eluiert. Die Elution wurde sechsmal wiederholt.

Alternativ wurde His-Rip1 auch denaturierend angereichert. Dazu wurden die Mitochondrien pelletiert (10 min, 19.000g, 2°C) und in Puffer A (s. Kapitel 2.9) resuspendiert (Endkonzentration 9,5 mg mitochondriales Protein/ml). Die Suspension wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann für 15 min bei 10.000 g und 2°C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand wurde auf ein Nickelnitrilotriacetat-Gelbett (100 µl/500 µg mitochondriales Protein) gegeben, das zuvor in Puffer A äquilibriert worden war. Dieser Ansatz wurde für 1-2 h bei 4°C inkubiert, wobei die Reaktionsgefäße mit konstanter Geschwindigkeit rotiert wurden. Danach wurde das Material als Säule gepackt und mit 10 Säulenvolumen Puffer A gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden schließlich in zehn Schritten mit je 0,5 ml Puffer B (s. Kapitel 2.9) eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden auf Eis gesammelt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.4.5 Verdau mit der TEV-Protease

Die TEV-Protease (s. Kapitel 2.4.3.2) wurde eingesetzt, um den Histidinytag von Rip1-Varianten mit einer TEV-Schnittstelle (s. Kapitel 2.1.9) abzuspalten. Dazu wurden die Elutionsfraktionen mit den angereicherten Rip1-Varianten (s. Kapitel 2.4.3.1) bei 16°C über Nacht mit der Protease (Endkonzentration 25 mg/ml) inkubiert. Nach der Proteolyse wurde die TEV-Protease bei 4°C an ein Nickelnitrilotroacetat-Gelbett gebunden und vom verdauten Rip1 abgetrennt. Dazu wurde der Ansatz mit Phosphatpuffer A (s. Kapitel 2.9) 1 : 2 verdünnt und mit 100 µl Nickelnitrilotroacetat versetzt, das zuvor in Phosphatpuffer A äquilibriert worden war. Die Bindung wurde für 30 min bei 4°C durchgeführt. Danach wurde das Gelbett abgetrennt (1 min, 30g, 4°C) und die verbleibende Lösung mit dem verdauten Rip1 wurde aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.4.6 Chemische Quervernetzung mit Glutaraldehyd

Ausgangsmaterial für die chemische Quervernetzung war angereichertes His-Bcs1 (s. Kapitel 2.4.4.1). Die Elutionsfraktion wurde mit eisgekühltem SH-Puffer (s. Kapitel 2.9) verdünnt (Verdünnungsfaktor 3,4) und mit 0,25% Glutaraldehyd (0,29 mg/mg mitochondrialem Protein im Anreicherungsansatz, entspricht ca. 0,05 mg/µg His-Bcs1) versetzt. Das Glutaraldehyd wurde zuvor als 0,8%ige Stammlösung in SH-Puffer angesetzt. Die Quervernetzung wurde für 10 min auf Eis durchgeführt. Danach wurde die Reaktion mit Glycin pH 8,8 (Endkonzentration 40 mM) abgestoppt. Nach 10 min auf Eis wurden die Proben mit Laemmli-Puffer oder BN-Probenpuffer (s. Kapitel 2.9) versetzt und mittels Gelelektrophorese (s. Kapitel 2.4.9 und 2.4.10) analysiert.

2.4.7 Test zur Interaktion von Bcs1 und Rip1 in Mitochondrienlysaten

Isolierte Mitochondrien (s. Kapitel 2.3.2) wurden abzentrifugiert (10 min, 19.000g, 2°C) und in Schägger-Puffer (s. Kapitel 2.9) mit Protease Arrest Reagent (Verdünnung 1 : 100) resuspendiert (Endkonzentration 8 mg/ml). Die resuspendierten Mitochondrien wurden für 10 min mit Digitonin (4,2 mg/ mg mitochondriales Protein) auf Eis lysiert. Das erhaltene Lysat wurde durch einen Zentrifugationsschritt (10 min, 10.000g, 2°C) von unlöslichen Membranfragmenten befreit. Der Überstand wurde mit rekombinantem Rip1 (s. Kapitel 2.1.9 und 2.4.3) versetzt (2 µg/ 50 µg mitochondriales Protein) und für 20 min bei 10°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 10.000g, 2°C) wurde der Überstand mit BN-Probenpuffer (s. Kapitel 2.9) versetzt und mittels Gelelektrophorese (s. Kapitel 2.4.8 und 2.4.9) analysiert.

2.4.8 Synthese mitochondrialer Vorläuferproteine in Retikulozytenlysat

Zur Synthese von radioaktiv markierten Vorläuferproteinen wurden pGEM4-Konstrukte (s. Kapitel 2.1.9) verwendet, deren genetische Information *in vitro* mithilfe der SP6-RNA-Polymerase transkribiert wurde. Ein Ansatz enthielt 30 µl Transkriptionsprämix (s. Kapitel 2.9), 6,25 nmol M⁷G(5')ppp(5')G, 1 µl RNasin (40 U/µl) und 15 µl Plasmid-DNA. Die Transkription wurde in Gegenwart von 1 U SP6-RNA-Polymerase bei 37°C für 1h durchgeführt. Im Anschluss wurde die erzeugte mRNA *in vitro* in einem Kaninchen-Retikulozytenlysat translatiert. Zuvor musste die RNA gefällt werden. Dazu wurde der Transkriptionsansatz mit 5 µl 10 M Lithiumchlorid und 150 µl Ethanol versetzt und für 30 min bei -20°C inkubiert. Danach konnte die RNA durch einen Zentrifugationsschritt (30 min, 25.000g, 4°C) sedimentiert werden. Das erhaltene Pellet wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert (10 min, 25.000g, 4°C) und dann bei Raumtemperatur getrocknet. Für die Translation wurde die RNA mit 0,75 µl RNasin versetzt und dann in 30 µl sterilem Wasser aufgenommen. Ein Translationsansatz enthielt neben der RNA 140 µl Retikulozytenlysat, 8 µl eines Aminosäuregemischs (1 mM aller proteinogenen Aminosäuren außer Methionin), 4 µl RNasin. Zum Zwecke der radiokativen Markierung war das Retikulozytenlysat mit 16 µl [³⁵S]Methionin (10 µCi) versetzt. Die Translation wurde bei 30°C für 1h durchgeführt. Danach wurde der Ansatz für 30 min bei 90.000g und 4°C zentrifugiert und der resultierende Überstand wurde aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.4.9 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteingemische wurden in mit SDS versetzten Polyacrylamidgelen aufgetrennt, die aus Sammel-, Trenn- und Bodengel bestanden. Die Lösungen für die Herstellung der Gele setzten sich wie folgt zusammen:

Reagenz	Bodengel	Trenngel			Sammelgel
		16%	14%	5,5%	
Acrylamid-Bis (37.5 : 1) 30% (w/v)	6,7 ml	9 ml	7,9 ml	3,1 ml	0.83 ml
Tris 1,875 M pH 8,8	2 ml	3.5 ml	3.5 ml	3.5 ml	-
Tris 0,6 M pH 6,8	-	-	-	-	0.5 ml
Wasser	1,1 ml	4,2 ml	5,3 ml	10,1 ml	3,6 ml
10% SDS	100 µl	167 µl	167 µl	167 µl	50 µl
10 mg/ml Ammoniumpersulfat	50 µl	100 µl	100 µl	100 µl	25 µl
TEMED	25 µl	10 µl	10 µl	10 µl	5 µl

Die Gele wurden in Elektrophoreseapparaturen eingespannt, deren Reservoirs mit Elektrophoresepuffer (s. Kapitel 2.9) gefüllt wurden. Vor dem Auftragen wurden die Proben in Laemmli-Puffer (s. Kapitel 2.9) aufgenommen und durch Aufkochen bei 95°C denaturiert. Zur Trennung wurde pro Gel eine konstante Stromstärke von 25 mA angelegt. Als Standard für die molekularen Massen wurden Größenmarker der Firma Fermentas (Unstained Protein Molecular Weight Marker) oder der Firma Thermoscientific (Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder) verwendet.

2.4.10 Nativgelelektrophorese (Blue native PAGE)

Die Nativgelelektrophorese wurde nach Wittig et al. (Wittig et al., 2006) durchgeführt. Die verwendeten Gele bestanden aus Boden-, Trenn- und Probengel. Das Trenngel wurde bei 4°C mithilfe eines Gradientenmischers (Pumprate: 0,5 ml/min) gegossen. Dabei wurde die 11%ige Lösung vorgelegt und kontinuierlich überschichtet. Die Lösungen für die Herstellung der Gele setzten sich wie folgt zusammen:

Reagenz (s. Kapitel 2.9)	Probengel	4%ige Lösung	11%ige Lösung	Bodengel
AB-3-Mix	0,44 ml	0,75 ml	3,6 ml	1,2 ml
Gel-Puffer	2 ml	3 ml	5 ml	1,7 ml
Glyzerin	---	---	3,1 g	1,0 g
Wasser	3,75 ml	5,5 ml	3,75 ml	1,25 ml
10 mg/ml Ammoniumpersulfat	50 µl	37,5 µl	33,8 µl	11,3 µl
TEMED	5 µl	3,75 µl	3,38 µl	1,1 µl

Die Gele wurden in Elektrophoreseapparaturen eingespannt, deren Reservoirs mit gekühltem Kathoden- und Anodenpuffer (s. Kapitel 2.9) gefüllt wurden. Die Proben stammten aus chromatographischen Anreicherungen (Kapitel 2.4.4), die z.T. chemisch quervernetzt wurden (s. Kapitel 2.4.6), oder dem *in vitro*-Test zur BCS1-Rip1-Interaktion (Kapitel 2.4.7). Falls mitochondriale Fraktionen (s. Kapitel 2.3.2) analysiert werden sollten, wurden die Mitochondrien zunächst pelletiert (10 min, 19.000 g, 2°C) und in Schaggerpuffer (1µl/10 µg mitochondriales Protein, s. Kapitel 2.9) aufgenommen. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit BN-Probenpuffer (s. Kapitel 2.9) versetzt. Die Trennung erfolgte bei 4°C. Pro Gel wurde zunächst für 2h eine konstante Stromstärke von 15 mA und eine Spannung von 100 mV angelegt. Danach wurde der Kathodenpuffer durch Kathodenpuffer/10 ersetzt und die

Spannung wurde auf 500 mV erhöht. Die Trennung wurde dann für eine Zeitdauer fortgesetzt, die für die jeweilige Fragestellung geeignet war. Als Standards für die molekularen Massen wurden Thyreoglobulin und Ferritin (GE Healthcare) verwendet.

2.4.11 Coomassie-Blau-Färbung von SDS-Gelen

Zum Nachweis von Proteinen in SDS-Gelen wurden diese zunächst 10 min in 30% (v/v) Methanol und 7% (v/v) Essigsäure fixiert und anschließend für 1h in 50% (v/v) Methanol, 10 (v/v) Essigsäure, 0,3% (w/v) Coomassie Brilliant Blau (R-250) angefärbt. Zur Entfärbung wurden die Gele über Nacht in 30% (v/v) Methanol und 7% (v/v) Essigsäure geschüttelt.

2.4.12 Transfer von Proteinen auf Membranen (Western Blot)

Proteine wurden von Polyacrylamidgelen (s. Kapitel 2.4.9 und 2.4.10) auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen transferiert. Nitrozellulosemembranen wurden für SDS-Gele (s. Kapitel 2.4.9), PVDF-Membranen für Nativgele (s. Kapitel 2.4.10) verwendet. Die PVDF-Membranen wurden vor dem Blotten 10 min in Methanol aktiviert. Die Membranen wurden in einem Reservoir mit Blotpuffer (s. Kapitel 2.9) mit dem Gel beschichtet so zwischen zwei Whatman-Filterpapiere gebettet. Der Transfer erfolgte nach dem Wet-Blot-Prinzip in einem 5l-Tank und wurde bei 4°C bei einer konstanten Stromstärke von 380 mA für 45 min durchgeführt. Nach dem Transfer wurden Proteinbanden auf Nitrozellulosemembranen durch Färbung mit 0,2% (w/v) Ponceau S in 3% (w/v) Trichloressigsäure sichtbar gemacht. PVDF-Membranen zeigten ohne weitere Behandlung Banden, die mit Coomassie Brilliant Blue G-250 aus dem BN-Probenpuffer (s. Kapitel 2.9) gefärbt waren.

2.4.13 Autoradiographie

Radioaktiv markierte Proteine wurden nach Elektrophorese (s. Kapitel 2.4.9 und 2.4.10) und Western Blot (s. Kapitel 2.4.12) als autoradiographische Signale auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht. Dazu wurden die Membranen getrocknet und mit einem Röntgenfilm beschichtet, der nach einem von der Signalintensität abhängigen Zeitraum entwickelt wurde.

2.5 Immunologische Untersuchungsmethoden

2.5.1 Eingesetzte Antikörper

Die für diese Arbeit eingesetzten Antikörper sind in Tabelle 2.3 zusammengefasst.

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
α Bcs1 (polyklonal)	Kaninchen	1 : 250 in 5%iger Blockierlösung I (s. Kapitel 2.9), 1 : 1500 in PBS mit 0,1% Tween-20	Eigenproduktion
α Cyt1 (polyklonal)	Kaninchen	1 : 250 in 5%iger Blockierlösung I (s. Kapitel 2.9)	Eigenproduktion
α Rip1 (polyklonal)	Kaninchen	1 : 250 in 5%iger Blockierlösung I (s. Kapitel 2.9), 1 : 1500 in PBS mit 0,1% Tween-20	Eigenproduktion
α His ₅ (monoklonal)	Maus	1 : 2000 in 5%iger Blockierlösung I (s. Kapitel 2.9)	QIAGEN

2.5.2 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Der Bcs1-Antikörper wurde aus Serum mittels Affinitätschromatographie angereichert. Zu diesem Zweck wurde das Antigen an cyanbromidaktivierte Sepharose gebunden. Hierfür war es zunächst nötig, das Säulenmaterial in 1 mM HCl (10 ml/0,5g Sepharose 4B) 20 min unter Rotieren zu quellen und anschließend zu waschen (200 ml 1 mM HCl/0,5g Sepharose 4B). Das Antigen (s. Kapitel 2.4.3.3) wurde mithilfe einer PD10-Säule (s. Kapitel 2.11) in Kopplungspuffer (s. Kapitel 2.9) umgepuffert (2,5 mg Antigen/2,5 ml Kopplungspuffer) und 1h bei Raumtemperatur mit dem gequollenen Säulenmaterial unter Rotieren inkubiert. Anschließend wurde das Material als Säule gepackt, mit zunächst 6 ml Kopplungspuffer und dann mit 4 ml 1 M Ethanolamin gewaschen. Danach wurde die Säule für 2h bei Raumtemperatur mit 2 ml 1 M Ethanolamin rollend inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Am Ende wurde die Säule mit 6 ml Waschpuffer I und II (s. Kapitel 2.9) gewaschen, was dreimal in dieser Reihenfolge (I → II → I → II → I → II) wiederholt wurde. Nach Äquilibration in 0,05% (w/v) Natriumazid (in 100 mM Tris pH 8,0) konnte die Säule bei 4°C gelagert werden.

Das Serum wurde vor dem Auftragen auf die Säule mit 10 mM Tris pH 7,5 (24 ml/ 6 ml Serum) gemischt und auf 1 mM PMSF und 1 mM EDTA eingestellt. Diese Mischung wurde

auf die mit 10 mM Tris pH 7,5 äquilibrierte Säule gegeben, wobei der Durchfluss gesammelt und erneut auf die Säule gegeben wurde (insgesamt drei Mal). Nach Waschen mit 10 ml Waschpuffer III und IV (s. Kapitel 2.9) wurde mit 100 mM Natriumcitrat pH 4,0 und dann mit 100 mM Glycin pH 2,5 eluiert (je 10 ml). Die Elutionsfraktionen (je 1 ml) wurden sofort neutralisiert (Zugabe von 200 µl Tris pH 8,8) und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.5.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen

Proteine wurden von Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulosemembranen oder PVDF-Membranen transferiert (s. Kapitel 2.4.12). Nitrozellulosemembranen wurden vor der Applikation des gewünschten Antikörpers eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockierlösung I oder II (s. Kapitel 2.9) gesättigt. PVDF-Membranen wurden zur Sättigung 30 Minuten bei Raumtemperatur in PBS mit 0,5% (v/v) Tween20 inkubiert. Danach wurden Antiseren bzw. Antikörper für 2-3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C wie in Tabelle 2.3 angegeben mit der Membran inkubiert. Im Anschluss wurden die Membranen dreimal für zehn Minuten bei Raumtemperatur gewaschen (TBS für Nitrozellulosemembranen, PBS mit 0,1% (v/v) Tween20 für PVDF-Membranen). Daraufhin wurde ein geeignetes IgG (α Kaninchen bzw. α Maus, s. Tabelle 2.3) zugegeben, das an die Meerrettich-Peroxidase (=HRP) konjugiert war (s. Kapitel 2.7). Das IgG-Konjugat wurde hierfür in geeigneter Verdünnung gelöst (Nitrozellulosemembranen: α Kaninchen-IgG-HRP 1 : 10.000 in 5%iger Blockierlösung I, α Maus-IgG-HRP 1 : 5000 in 10%iger Blockierlösung I; PVDF-Membranen: α Kaninchen-IgG-HRP 1 : 20.000 PBS mit 0,1% (v/v) Tween20) und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit der Membran inkubiert. Vor der Detektion wurden die Membranen dreimal für zehn Minuten bei Raumtemperatur gewaschen (TBS für Nitrozellulosemembranen, PBS mit 0,1% (v/v) Tween-20 für PVDF-Membranen). Die Membranen wurden schließlich für ca. eine Minute mit Luminol-Reagenz (s. Kapitel 2.9) inkubiert und dann mit einer transparenten Folie abgedeckt. Auf die Folie wurde ein Röntgenfilm der Firma Kodak aufgelegt (zwischen 3 s und 15 min).

2.6 Chemikalien

Chemikalie	Bemerkung	Hersteller	Bestellnummer
Acrylamid	Acrylamid-Bis (37.5 : 1) 30% (w/v)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	P100373
Adenin		Calbiochem	1152
Adenosindiphosphat (ADP)		Sigma, München	A2754-100MG
Agar-Agar		Roth	5210.2
Agarose		Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	11404
Aktivkohle		Carl Roth GmbH	X865.3
Aminocaprinsäure (6-Aminohexansäure)		Merck, Darmstadt	8001451000
Ammoniumpersulfat (APS): $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$		Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	101218
Ampicillin (Amp)	Ampicillin- Natriumsalz	AppliChem, Darmstadt	0Q003839
AMP-PNP		Jena Bioscience	NU-407-50
Adenosintriphosphat (ATP)	Dinatriumsalz	Roche, Mannheim	10127523001
Bacto-Trypton		Becton Dickinson, USA	211705
Beta-Mercaptoethanol		Sigma, München	M7154
Bovines/ Rinderserumalbumin (BSA)	Fraktion V, frei von Fettsäuren	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	110908
Bradford-Reagenz		Biorad	500-0006
Bromphenolblau		Sigma, München	b-8026
Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)		Merck, Darmstadt	1.023.821.000
Chloramphenicol		AppliChem, Darmstadt	A1806.0025
Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva Blue G)		Serva Electrophoresis	35050

		GmbH, Heidelberg	060386???
Coumarinsäure		AppliChem, Darmstadt	A13791000
Digitonin		Calbiochem	300410
Dikaliumpyrophosphat (K ₂ HPO ₄)		Merck, Darmstadt	1.050.990.250
Dinatriumpyrophosphat (Na ₂ HPO ₄)		Merck, Darmstadt	1065660100
Dimethylsulfoxid (DMSO)		Sigma, München	D5879-500
1,4-Dithio-DL-threitol (DTT)	(R,R)-1,4-Dimercapto-butene-2,3-diol	AppliChem, Darmstadt	8R009950
Eisenchlorid (FeCl ₃)		Santa Cruz Biotechnology, INC	Sc-215192A
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)		Merck, Darmstadt	1.084.181.000
G418 (Geneticin)		Sigma, München	A1720-1G
Galaktose		Sigma, München	G-5388
Glukose		Merck, Darmstadt	1040745000
Glutaraldehyd	25%ige Lösung in Wasser (für Elektronen- mikroskopie)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	23114.01
Glycin		Merck, Darmstadt	5.001.901.000
Glyzerin		Sigma, München	G7757-1GA
Harnstoff		AppliChem, Darmstadt	24524
Hefeextrakt		Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	24549
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Hepes)		AppliChem, Darmstadt	A3714.0500
L-Histidin		Calbiochem, USA	3810

Imidazol (1,3-Diaza-2,4-cyclopentadiene)		AppliChem, Darmstadt	1C000528
Isopropyl-β-D-thiogalaktopyransid (IPTG)		Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	26600.06
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)		Merck, Darmstadt	1.048.719.050
Laktat		Merck, Darmstadt	1.00366.9025
L-Leucin		Sigma, München	17-0963-03
Lithiumacetat		Sigma, München	L-4158
L-Lysin		Fluka	62840
Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazindionsäure)		Sigma, München	A-8511
m ⁷ G(5')ppp(5')G	5'-Cap	Sigma, München	
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ ·6H ₂ O)		Merck, Darmstadt	1058330250
Milchpulver		Spinnrad, Bad Segeberg	2231018
Natriumazid (NaN ₃)		Merck, Darmstadt	1.06688.0100
Natriumchlorid (NaCl)		Merck, Darmstadt	1.06404.5000
Natriumdodecylsulfat (SDS)		Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	20760
Natriumhydroxid (NaOH)		Merck, Darmstadt	1.06482.1000
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)		Merck, Darmstadt	1.06329.1000
Nickelnitrilotriacetat		QIAGEN, Hilden	30236
Pepton		Merck, Darmstadt	48625
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)		Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	32395
Ponceau S		Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	33429
Protease Arrest Reagent		Calbiochem	539124
Salzsäure	37%	Merck, Darmstadt	1003142500

Sorbitol		Sigma, München	S-1876
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)		Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	071394
Trichloressigsäure (TCA)		Merck, Darmstadt	1008070250
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)		AppliChem, Darmstadt	A1378.1000
Triton X-100		Merck, Darmstadt	1.08603.1000
L-Tryptophan		Merck, Darmstadt	1083740100
Tween20		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P7949-500
Uracil		Calbiochem, USA	6630
Yeast nitrogen base		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Y1251-1KG
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	30%	Merck, Darmstadt	1.07209.0250

2.7 Enzyme

Name	Hersteller	Bestellnummer
BamHI	New England Biolabs	R0136M
EcoRI	New England Biolabs	R0101M
HindIII	New England Biolabs	R0104M
Lysozym	AppliChem, Darmstadt	A4972-0010
Meerrettichperoxidase-Konjugate (Goat-Anti-Mouse/Rabbit (IgG (H+L)-HRP Conjugate)	Biorad Laboratories, Hercules (USA)	170-6516/170-6515
NaeI	New England Biolabs	R0190L
Pfu DNA-Polymerase	Promega	M7741
Proteinase K	Roche, Mannheim	3115801001
RNase A	Serva, Heidelberg	34390.02
SP6-Polymerase	Biozym	SL925K
T4-DNA-Ligase	Promega	M1804
TEV-Protease	addgene	s. Kapitel 2.4.3.2
XhoI	New England Biolabs	R0146M
XmaI	New England Biolabs	R0180M
Zymolyase	Seikagaku/wak	120491

2.8 Kits

Kit	Hersteller	Bestellnummer
Pure Yield™ Plasmid Midiprep System	Promega, Heidelberg	A2495
Wizard SV Gel and PCR Clean-up System	Promega, Heidelberg	A9282X
Phusion* Site-Directed Mutagenesis Kit	ThermoScientific	F541
QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit, 10 Rxn	Stratagene	200521

2.9 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Verwendung	Zusammensetzung
AB-3-Mix	Nativgele (Kapitel 2.4.10)	48g Acrylamid und 1,5 g Bisacrylamid pro 100 ml
Anodenpuffer	Blue native PAGE (Kapitel 2.4.10)	25 mM Imidazol, pH 7,0
Blockierlösung I	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen (Kapitel 2.5.3)	5-10% (w/v) Magermilchpulver in TBS
Blockierlösung II	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen (Kapitel 2.5.3)	3% (w/v) BSA in TBS
Blotpuffer	Western Blot (Kapitel 2.4.12)	150 mM Glycin, 20 mM Tris-Base, 20% (v/v) Methanol
BN-Probenpuffer	Blue native PAGE (Kapitel 2.4.10)	5% (w/v) Coomassie blue G-250, 50% (v/v) Glycerin, 50% (v/v) Schäggerpuffer
Kathodenpuffer	Blue native PAGE (Kapitel 2.4.10)	50 mM Tricin, 7,5 mM Imidazol, 0,02% (w/v) Coomassie blue G-250, pH 7,0
Kathodenpuffer/10	Blue native PAGE (Kapitel 2.4.10)	50 mM Tricin, 7,5 mM Imidazol, 0,002% (w/v) Coomassie blue G-250, pH 7,0

Kopplungspuffer	Affinitätsreinigung von Antikörpern (Kapitel 2.5.2)	500 mM NaCl, 100 mM NaHCO ₃ , pH 8,3
Ligationspuffer	Ligation (Kapitel 2.1.6)	Promega (Katalognummer C1263)
Luminol-Reagenz	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen (Kapitel 2.5.3)	1,1 mM Luminol, 0,2 mM Cumarinsäure, 0,25 mM H ₂ O ₂ , 100 mM Tris-HCl pH 8,5
DNA-Probenpuffer	Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.1.5)	0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylenxyanol FF, 30% (v/v) Glycerin
Elektrophoresepuffer	SDS-PAGE (Kapitel 2.4.9)	385 mM Glycin, 50 mM Tris-HCl, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,4
Gelfiltrationspuffer	Gelfiltration (Kapitel 2.4.3.2)	25 mM Natriumphosphat pH 8,0, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM DTT, 10% Glycerin
Gelpuffer (3x)	Blue native PAGE (Kapitel 2.4.10)	75 mM Imidazol, 1,5 M 6-Aminocaprinsäure, pH 7,0
Importpuffer	Import radiokativ markierter Proteine in isolierte Mitochondrien (Kapitel 2.3.4)	0,6 M Sorbitol, 50 mM Hepes/KOH pH 7,4, 80 mM KCl, 10 mM Magnesiumacetat, 2 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4, 2,5 mM MnCl ₂ , 3% (w/v) fettsäurefreies BSA
Kompetenzmedium I	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen (Kapitel 2.1.7)	100 mM CaCl ₂ , 20 mM RbCl ₂
Kompetenzmedium II	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen (Kapitel 2.1.7)	100 mM CaCl ₂ , 15% (v/v) Glycerin
1x Laemmli-Puffer	SDS-PAGE (Kapitel 2.4.9)	2% (w/v) SDS, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 10% (v/v) Glycerin, 60 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,02% (w/v) Bromphenolblau
LB _{Amp}	Anzucht von <i>E. coli</i> (Kapitel 2.4.3)	10 g/l Bacto Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 150 g/l NaCl, 100 µg/ml, pH 7,5
Lysepuffer A	DNA-Präparation aus <i>E. coli</i>	1 mM EDTA, 0,1 N NaOH, 0,5% (w/v) SDS, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5

Lysepuffer B	DNA-Präparation aus <i>S. cerevisiae</i> (Kapitel 2.1.1)	2% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA
MP1	Mitochondrienpäparation (Kapitel 2.3.2)	100 mM Tris (pH nicht eingestellt), 10 mM DTT
MP2	Mitochondrienpäparation (Kapitel 2.3.2)	1,2 M Sorbitol, 20 mM KH_2PO_4 , pH 7,4
MP3	Mitochondrienpäparation (Kapitel 2.3.2)	10 mM Tris, pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,2% (w/v) BSA, 1 mM PMSF, 0,6 M Sorbitol
Natriumphosphat		1M Na_2HPO_4 , pH 8,0 (titriert mit 1M NaH_2PO_4)
PBS (Phosphate buffered saline)	Immunologischer Nachweis von Proteinen (Kapitel 2.5.3)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM Natriumphosphat, pH 7,4
Phophatpuffer A	Affinitätschromatographie (Kapitel 2.4.4)	50 mM Natriumphosphat pH 8,0, 100 mM NaCl, 20 mM Imidazol pH 8,0, 1 : 100 Protease Arrest Reagent, 5% (v/v) Glycerin
Phophatpuffer A ₂	Affinitätschromatographie (Kapitel 2.4.3)	50 mM Natriumphosphat pH 8,0, 100 mM NaCl, 20 mM Imidazol pH 8,0, 10% (v/v) Glycerin
Phophatpuffer B	Affinitätschromatographie (Kapitel 2.4.4)	50 mM Natriumphosphat pH 8,0, 100 mM NaCl, 300 mM Imidazol pH 8,0, 1 : 100 Protease Arrest Reagent, 5% (v/v) Glycerin
Phophatpuffer B ₂	Affinitätschromatographie (Kapitel 2.4.3)	50 mM Natriumphosphat pH 8,0, 100 mM NaCl, 300 mM Imidazol pH 8,0, 10% (v/v) Glycerin
Puffer A	Affinitätschromatographie (Kapitel 2.4.3)	50 mM Natriumphosphat pH 8,0, 20 mM Imidazol pH 8,0, 7 M Harnstoff, 0,5% (v/v) Triton X-100, 2 mM PMSF
Puffer B	Affinitätschromatographie (Kapitel 2.4.3)	50 mM Natriumphosphat pH 8,0, 300 mM Imidazol pH 8,0

Pfu-Reaktionspuffer	PCR (Kapitel 2.1.3)	Promega
Schäggerpuffer	Blue native PAGE (Kapitel 2.4.10)	50 mM NaCl, 50 mM Imidazol, 2 mM 6-Aminocaprinsäure, 1 mM EDTA, pH 7,0
SH	Suspension von Mitochondrien (Kapitel 2.3.2)	0,6 M Sorbitol 20 mM Hepes, pH 7,4
SH/KCl	<i>in vitro</i> -Import (Kapitel 2.3.4)	0,6 M Sorbitol, 80 mM KCl, 20 mM Hepes, pH 7,4
TAE-Puffer	Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.1.5)	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0
TBS	Immunologischer Nachweis von Proteinen (Kapitel 2.5.3)	50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4
Transkriptionsprämix	<i>in vitro</i> -Synthese mitochondrialer Vorläuferproteine (Kapitel 2.4.8)	40 mM Hepes pH 7,4, 6 mM Magnesiumacetat, 2mM Spermidin, 100 µg/ml BSA, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP, 0,5 mM CTP, 0,5 mM UTP, 0,1 mM GTP
Waschpuffer I	Affinitätsreinigung von Antikörpern (Kapitel 2.5.2)	500 mM NaCl, 100 mM Acetat, pH 4,0
Waschpuffer II	Affinitätsreinigung von Antikörpern (Kapitel 2.5.2)	500 mM NaCl, 100 mM Tris, pH 8,0
Waschpuffer III	Affinitätsreinigung von Antikörpern (Kapitel 2.5.2)	10 mM Tris pH 7,5
Waschpuffer IV	Affinitätsreinigung von Antikörpern (Kapitel 2.5.2)	10 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,5

2.10 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller	
Nitrozellulosemembranen (POTRAN BA83, Porengröße 0,2 µm)	Schleicher und Schuell	
Röntgenfilme (BioMax MR)	Kodak	
Whatman-Filterpapiere (MN 440 B)	Schleicher und Schuell	10381961

2.11 Zelllinien

Spezies	Stamm	Marker
<i>Escherichia coli</i>	DH5α	(Φ80 lacZΔM15)Δ[lacZYA-argF] U196 <i>recA1 endA1 r⁻ m⁺ gyrA thi-1 hsdR17 rsupE44 rel A1</i>
<i>Escherichia coli</i>	XL1-blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 rel A1</i> Lac[F' <i>pro A⁺B⁺ lacI^qΔM15 Tn10(Tet^r)</i>]
<i>Escherichia coli</i>	BL21	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS</i> λ DE3 = λ <i>sBamHI</i> Δ <i>EcoRI-B</i> <i>int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	W303-1A	<i>ade2-1, his3-1, 15, leu2-3, 112, trp1-1, ura3-1</i>

3. Ergebnisse

3.1 Funktionelle Charakterisierung von Bcs1

Die Deletion von Bcs1 ($\Delta bcs1$) hat zur Folge, dass Rip1 nicht in den Komplex III der Atmungskette eingebaut wird (Nobrega et al., 1992). Dies ist auf die Funktion von Bcs1 als Translokase für den Export von Rip1 über die mitochondriale Innenmembran zurückzuführen (Wagener et al., 2011). Über den Mechanismus dieser Translokation war allerdings nichts bekannt. Um ein besseres Verständnis der Funktion von Bcs1 zu schaffen, sollte einerseits die Struktur des oligomeren Komplexes (BCS1) untersucht werden, da es zu klären galt, wie es Rip1 über die Innenmembran transportieren kann. Zweitens sollte die Interaktion von Bcs1 mit seinem Substrat Rip1 genauer charakterisiert werden.

3.1.1 Charakterisierung des BCS1-Komplexes

3.1.1.1 Anreicherung des nativen BCS1-Komplexes

Um den BCS1-Komplex mittels Affinitätschromatographie aufzureinigen, wurde eine Variante mit einer N-terminalen Hexahistidinylsequenz (im Folgenden kurz His₆-Markierung) in einem $\Delta bcs1$ -Hintergrund exprimiert. Der N-Terminus von Bcs1 ist zum Intermembranraum hin orientiert und geht der Transmembrandomäne (Aminosäuren 44-68) voraus (Fölsch et al., 1996). Die His₆-markierte Bcs1-Variante war funktionell. Ihre Expression komplementierte den Phänotyp des $\Delta bcs1$ -Stammes (defizientes Wachstum auf obligat aeroben Kohlenstoffquellen). Das His₆-markierte Bcs1 konnte spezifisch aus isolierten Mitochondrien angereichert werden, was durch Western-Blot-Analyse bestätigt wurde (Abb. 3.1a). In der Nativgelelektrophorese zeigte der His₆-markierte Komplex eine apparente molekulare Masse von 500-550 kDa (Abb. 3.1b).

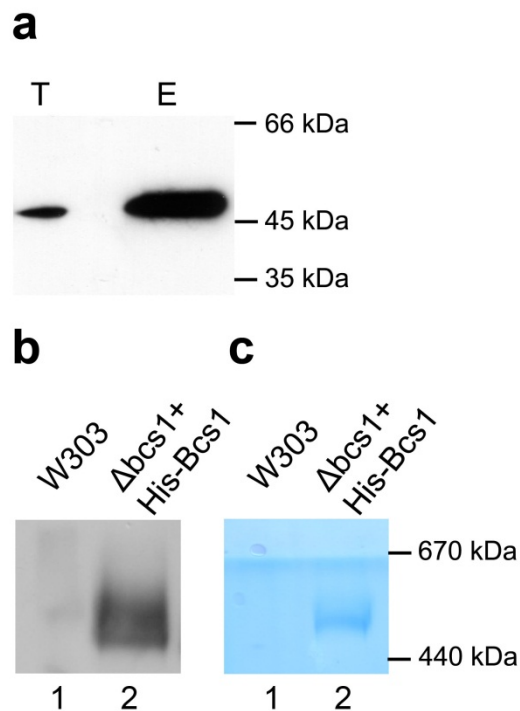


Abb. 3.1: Chromatographische Anreicherung von His-Bcs1

His-Bcs1 wurde in einem $\Delta bcs1$ -Hintergrund exprimiert und aus isolierten Mitochondrien nach Lyse mit Digitonin mittels Nickel-Nitrilotriacetat-Affinitätschromatographie angereichert.

- His-Bcs1 wurde aus 0,7 mg mitochondrialem Protein (T = 2%) angereichert und nativ eluiert (E). Die Proben wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und mittels Westernblot analysiert. His-Bcs1 wurde mit einem Antikörper gegen die Hexahistidinyalsequenz dekoriert.
- Nativ eluiertes His-Bcs1 wurde mittels Nativgelelektrophorese und Western Blot analysiert (Spur 2). Als Kontrolle wurden lysierte Wildtyp-Mitochondrien (W303, Spur 1) verwendet. His-Bcs1 wurde mit einem Antikörper gegen Bcs1 dekoriert.
- Nativ eluiertes His-Bcs1 wurde mittels Nativgelelektrophorese analysiert (Spur 2, Coomassie-gefärbte Bande). Als Kontrolle wurden lysierte Wildtyp-Mitochondrien (W303, Spur 1) verwendet, um sicherzustellen, dass Bcs1 nicht unspezifisch an das chromatographische Trägermaterial bindet.

3.1.1.2 Charakterisierung der oligomeren Zusammensetzung des BCS1-Komplexes

Aufgrund der Zugehörigkeit zur Familie der AAA-Proteine (Frickey and Lupas, 2004) kann man vermuten, dass Bcs1 Hexamere bildet. In der Tat wurden bereits hochmolekulare, Bcs1-immunreaktive Komplexe mittels Nativgelelektrophorese und Western-Blot-Analyse nachgewiesen (Nouet et al., 2009). Eine massenspektrometrische Analyse des angereicherten BCS1 im Rahmen dieser Arbeit zeigte, dass der beobachtete Komplex keine weiteren AAA-Proteine enthält. Deshalb konnte davon ausgegangen werden, dass es sich um ein Homooligomer handelte.

Die aus der Nativgelelektrophorese ermittelte apparente Masse eines homooligomeren BCS1 (500 – 550 kDa) ist nicht mit der theoretischen Masse eines Hexamers ($318 \text{ kDa} = 6 \times 53 \text{ kDa}$) vereinbar. Daher sollten die Bcs1-Monomere kovalent miteinander verknüpft werden, um eine genauere Abschätzung der molekularen Masse mittels SDS-Gelelektrophorese zu erlauben.

Als chemischer Vernetzer wurde Glutaraldehyd eingesetzt. Wurde eine Fraktion des angereicherten His-Bcs1 mit Glutaraldehyd behandelt, konnte man in der SDS-Gelelektrophorese eine Spezies mit einer apparenten Masse von ca. 320 kDa beobachten (Abb. 3.2). In der Nativgelelektrophorese wanderte diese Spezies auf gleicher Höhe wie der unbehandelte Komplex (Abb. 3.2). Das heißt, das Laufverhalten im Nativgel spiegelt nicht die tatsächliche molekulare Masse des BCS1-Komplexes wider. Basierend auf den Ergebnissen der SDS-Gelelektrophorese liegt eine hexamere Stöchiometrie des BCS1-Komplexes nahe. Inzwischen wurde diese Stöchiometrie in einer Kooperation mit P. Wendler mittels „*Negative staining*“ und Elektronenmikroskopie bestätigt. Die Diskrepanz zwischen den molekularen Massen, die sich aus Nativ- und SDS-Gelelektrophorese ergibt, ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass die hydrophoben Bereiche von BCS1 ein ungewöhnliches Laufverhalten im Nativgel bedingen.

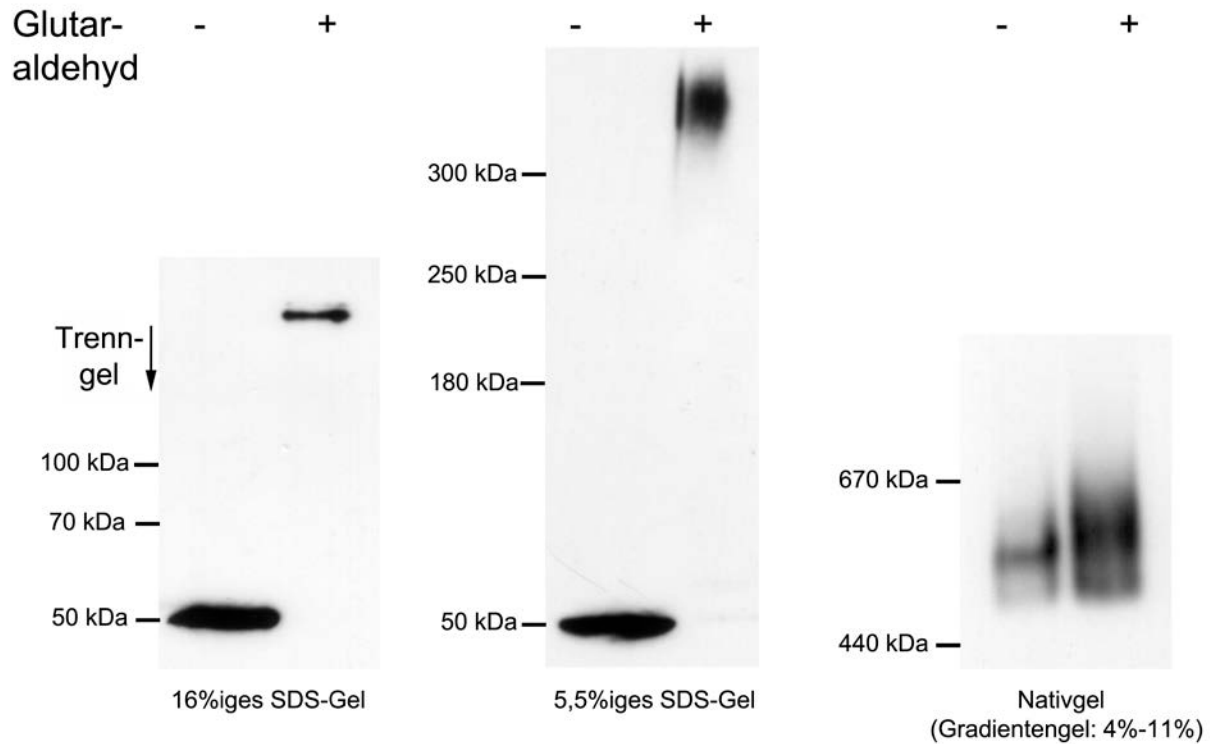


Abb. 3.2: Chemische Vernetzung von Bcs1-Monomeren mit Glutaraldehyd

His-Bcs1 wurde mittels Affinitätschromatographie angereichert und nativ eluiert (s. Abb. 3.1). Die Elutionsfraktion wurde in zwei Ansätze geteilt, die entweder mit Puffer (-) oder mit Glutaraldehyd (+) behandelt wurden. Jede Probe wurde mittels SDS-PAGE (16%ig und 5,5%ig) und Nativ-Gelelektrophorese analysiert. Die Proteine wurden auf eine Membran transferiert und mit einem Antikörper gegen die Hexahistidynylsequenz (SDS-Gele) oder Bcs1 (Nativgel) dekoriert.

3.1.2 Biochemische Charakterisierung von BCS1

3.1.2.1 Rip1 geht eine ATP-abhängige Wechselwirkung mit dem BCS1-Komplex ein

Um die Interaktion von BCS1 mit seinem Substrat Rip1 biochemisch zu untersuchen, wurde eine N-terminal His₆-markierte Rip1-Variante (His-Rip1₃₁₋₂₁₅) eingesetzt, die in *E. coli* exprimiert und mittels Affinitätschromatographie denaturierend angereichert wurde. Dieses rekombinante Rip1 entsprach der Aminosäuresequenz des maturierten Proteins.

Die Untersuchungen erfolgten mit Mitochondrienlysaten. Dazu wurden isolierte Mitochondrien mit 3% Digitonin behandelt. Die Rip1-Varianten wurden mit den jeweiligen Proben 20 min bei 10°C inkubiert. Nach einer Inkubation wurde ein verändertes Wanderverhalten der Bcs1-immunreaktiven Banden im Nativgel beobachtet (Abb. 3.3). Als Negativkontrolle wurden Su9-DHFR (Su9 = Aminosäuren 1-67 der Untereinheit 9 der F₁F₀-ATPase, DHFR = Dihydrofolatreduktase aus der Maus) und reduziertes, carboxymethyliertes Lactalbumin (RCMLA) verwendet, welche das Laufverhalten nicht veränderten. Daraus ist ersichtlich, dass der beobachtete Einfluss von Rip1 auf das Laufverhalten spezifisch war und vermutlich auf eine unmittelbare Wechselwirkung zurückzuführen ist.

Die geschilderten Experimente konnten mit dem chromatographisch angereicherten His-Bcs1 rekapituliert werden. Wie Abb. 3.3 zeigt, beeinflusste His-Rip1 die elektrophoretische Mobilität von BCS1 hier in der gleichen, ATP-abhängigen Weise wie in den Experimenten mit lysierten Mitochondrienpräparaten. Diese Beobachtung stellte sicher, dass der angereicherte His-BCS1-Komplex funktionell war. Deshalb konnte er eingesetzt werden, um die Interaktion mit Rip1 *in vitro* nachzuweisen.

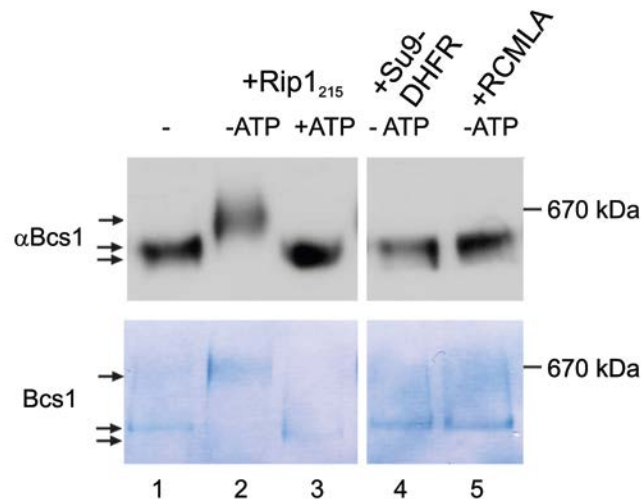


Abb. 3.3: Elektrophoretische Mobilität von BCS1 und Wechselwirkung mit Rip1

Die elektrophoretische Mobilität von BCS1 im Nativgel wurde mit Mitochondrienlysaten (oben) und chromatographisch angereichertem His-BCS1 (unten) untersucht. Ohne Zusatz (Spur 1) wies der Komplex eine charakteristische Wandergeschwindigkeit auf, die sich nach Zugabe von rekombinantem Rip1 (Spur 2) verlangsamte. Wurde Rip1 in Gegenwart von 2 mM ATP zugegeben (Spur 3), beschleunigte sich das Laufverhalten geringfügig. Kontrollproteine wie ein Fusionsprotein aus der Untereinheit 9 der F_1F_0 -ATPase (Su9) und der Dihydrofolatreduktase aus der Maus (DHFR, Spur 4) oder reduziertes, carboxymethyliertes Lactalbumin (RCMLA, Spur 5) änderten das Laufverhalten von BCS1 nicht.

Um die physiologische Relevanz der oben geschilderten Beobachtung zu untersuchen, wurde die Inkubation parallel mit und ohne ATP-Zusatz durchgeführt. Wie bei allen AAA-ATPasen sollte die physiologische Aktivität von BCS1 die Hydrolyse von ATP erfordern. Überraschenderweise war das verlangsamte Laufverhalten nur bei Proben ohne ATP-Zusatz zu beobachten. Der Zusatz von ATP führte dagegen zu einem leicht beschleunigten Laufverhalten (Abb. 3.3).

3.1.2.2 Eine bestehende Wechselwirkung zwischen BCS1 und Rip1 kann durch ATP-Zugabe gelöst werden

Ein weiterführendes Experiment sollte nun zeigen, welcher Schritt der Interaktion von Rip1 mit BCS1 ATP-abhängig ist. Hierfür wurde eine Probe (Abb. 3.4, Spur 2), in der BCS1 mit Rip1 wie in Kapitel 3.1.2.1 beschrieben inkubiert wurde, in vier Ansätze geteilt. Die Ausgangsprobe und jeder Ansatz wurden geteilt und unmittelbar auf ein Nativgel, oder nach affinitätschromatographischer Anreicherung auf ein SDS-Gel aufgetragen. Der erste Ansatz wurde nicht weiter behandelt (Spur 3), wogegen der zweite mit ATP versetzt wurde (Spur 4). Der dritte Ansatz wurde mit ADP, der vierte mit dem nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogon AMP-PNP versetzt. Beim ersten, unbehandelten Ansatz (Spur 3) konnte die Bindung von Rip1 an BCS1 wie bei der Ausgangsprobe (Spur 2) weiterhin nachgewiesen werden. Im Nativgel manifestierte sich diese Bindung durch die bekannte Änderung des Laufverhaltens. Im Gegensatz dazu wanderte BCS1 nach ATP-Zugabe (Spur 4) im Vergleich zur Kontrolle ohne Rip1 (Spur 1) unverändert. Dass Rip1 bei diesem Ansatz im Zuge einer ATP-Hydrolyse freigesetzt wurde, zeigte sich an zwei Beobachtungen. Erstens wurde Rip1 nicht mehr wie bei der Ausgangsprobe (Spur 2) nach einer Anreicherung von His-BCS1 gefunden (Spur 4, SDS-PAGE). Zweitens hatten andere Nukleotide (Spur 5 und 6) keine Auswirkung und führen zu denselben experimentellen Befunden wie der unbehandelte Ansatz (Spur 3). Für den dritten Ansatz (Spur 5) wurde das nicht-hydrolysierbare ATP-Analogon AMP-PNP verwendet, während für den vierten (Spur 6) ADP zum Einsatz kam. Beide Nukleotide führten nicht zur einer Freisetzung von Rip1, wie sie bei ATP-Zusatz beobachtet wurde (Spur 4). Daraus lässt sich ableiten, dass nicht die Nukleotidbindung alleine, sondern erst die Nukleotidhydrolyse hinreichend für die Freisetzung von Rip1 ist.

Für das geschilderte Experiment musste eine neue Rip1-Variante verwendet werden. Die bisher eingesetzte Variante trug eine His₆-Markierung, die mit dem chromatographischen Trägermaterial (Nickelnitrilotriacetat) hätte wechselwirken können. Aus diesem Grund kam eine Rip1-Variante zum Einsatz, bei der die His₆-Markierung mithilfe der TEV-Protease entfernt worden war.

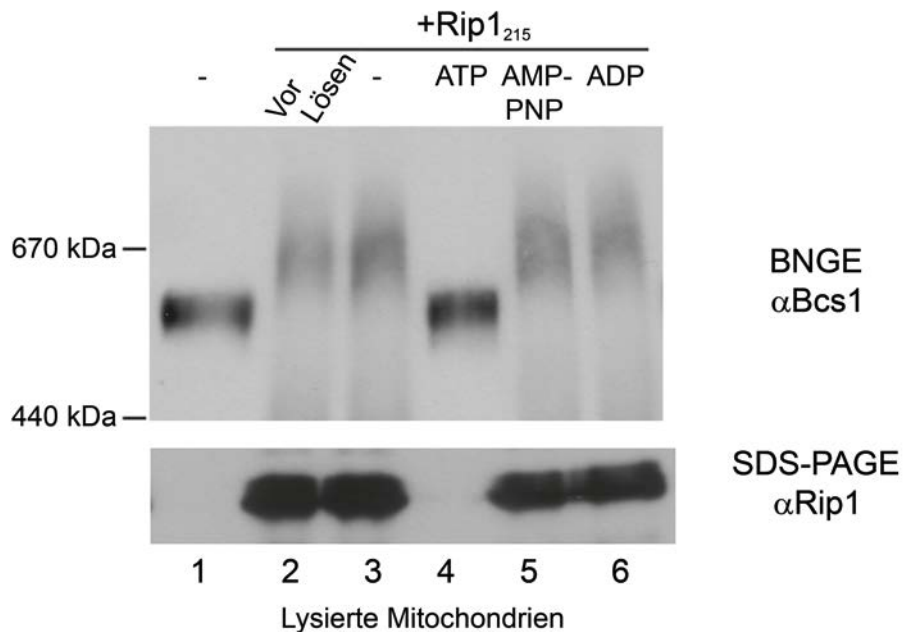


Abb. 3.4: Untersuchung der ATP-abhängigen Wechselwirkung von BCS1 mit Rip1

Lysierte Mitochondrien wurden für 20 min bei 10°C in Abwesenheit (Spur 1) oder Gegenwart (Spuren 2-6) von rekombinantem Rip1 inkubiert. Dann wurde die Probe mit Rip1 in fünf Ansätze geteilt (Spuren 2-6). Der erste wurde auf Eis gelagert (Spur 2), der zweite bis fünfte wurden bei 10°C weiter inkubiert. Diese Inkubation erfolgte ohne weitere Zusätze (Spur 3), in Gegenwart von 4 mM ATP (Spur 4), 4 mM AMP-PNP (Spur 5), oder 4 mM ADP (Spur 6). Nach 20 Minuten wurden alle Ansätze mittels Nativgelelektrophorese analysiert. Die Proteine wurden auf eine Membran transferiert und mit einem Antikörper gegen Bcs1 bzw. Rip1 dekoriert.

3.1.2.3 Eine ATP-Hydrolyse-Mutante von Bcs1 kann Rip1 nicht freisetzen

Um zu bestärken, dass der BCS1-Rip1-Komplex durch ATP-Hydrolyse gelöst wird, sollten Bcs1-Varianten untersucht werden, die Mutationen in den Aminosäuresequenzen tragen, die für ATP-Bindung oder -Hydrolyse nötig sind (s. Kapitel 1.4). Es war bekannt, dass die Mutationen K273A und P268L in der ATP-Bindestelle (Walker A) die Aktivität von Bcs1 ausschalten (Cruciat et al., 1999). Eine nähere Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit ergab jedoch, dass die Mutationen dazu führten, dass Bcs1 nicht oligomerisiert. Deshalb waren diese Bcs1-Mutanten nicht als Werkzeug für die genannte Fragestellung geeignet. Anders verhielt es sich mit der Bcs1-Variante, die eine Punktmutation in der Walker-Box B trug.

Die Mutation betraf Glutamat 319, das zu Glutamin mutiert worden war. Diese Bcs1-Variante wurde mit einer His₆-Markierung versehen und wie in dem in Kapitel 3.1.2.2 (Abb. 3.4) beschriebenen Experiment untersucht (Abb. 3.5). Wie der mutationsfreie BCS1-Komplex bildete die Variante einen hochmolekularen Komplex (Spur 1, BNGE) und war in der Lage, Rip1 zu binden (Spur 2, SDS-PAGE). Wurde die Probe nach erfolgter Bindung allerdings in die vier Ansätze geteilt und unter den angegebenen Bedingungen weiter inkubiert, dann wurde Rip1 in keinem der vier Fälle freigesetzt. Insbesondere führte der Zusatz von ATP (Spur 4) nicht zur Freisetzung von Rip1.

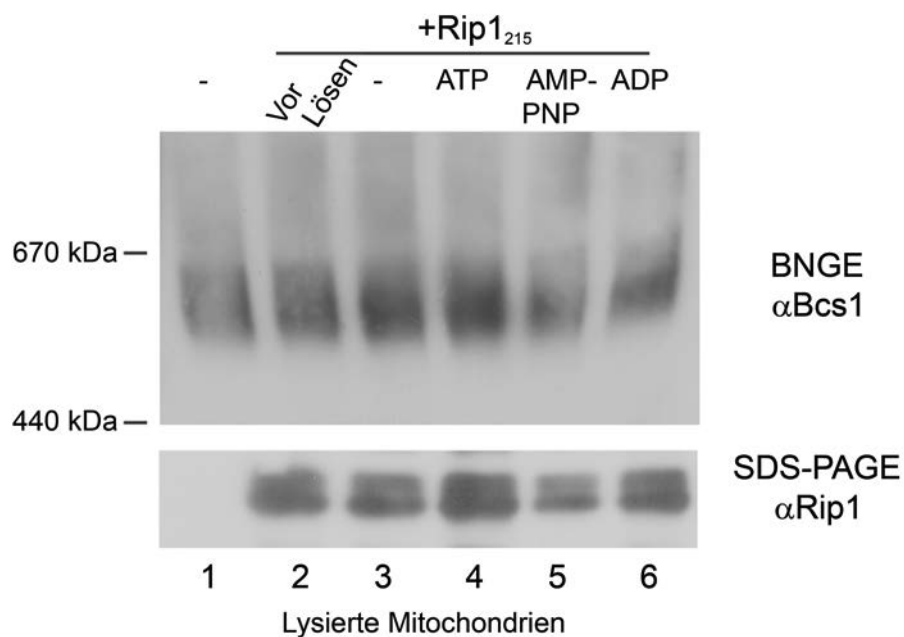


Abb. 3.5: Untersuchung einer Bcs1-Variante mit Punktmutation in der ATP-Hydrolyse-Stelle

Die Bcs1-Variante mit der Mutation E319Q wurde in einem $\Delta bcs1$ -Hintergrund exprimiert. Isolierte Mitochondrien wurden lysiert und wie in Abb. 3.4 beschrieben mit rekombinantem Rip1 und weiteren Zusätzen behandelt.

Anders als für das mutationsfreie BCS1 ging die Bindung von Rip1 nicht mit einer veränderten Laufgeschwindigkeit in der Nativgelelektrophorese einher. Dies kann auf einer fehlenden Konformationsänderung bei der Bildung des BCS1-Rip1-Komplexes beruhen, oder eventuell auf eine verringerte Stabilität des mutierten Komplexes zurückzuführen sein, so dass die Bindung zu Rip1 der Elektrophorese nicht standhält. Eindeutig ist jedenfalls der Befund, dass die fehlende Fähigkeit zur ATP-Hydrolyse einhergeht mit der Unfähigkeit, Rip1 nach erfolgter Bindung wieder zu lösen.

3.2 Analyse der Wechselwirkung zwischen BCS1 und Rip1 mit isolierten Mitochondrien

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass BCS1 mit Rip1 *in vitro* eine Wechselwirkung eingeht, die Nukleotid-abhängig wieder gelöst wird. In Hefe konnte jedoch bis jetzt eine stabile Interaktion zwischen den endogenen Proteinen nicht nachgewiesen werden (Cruciat et al., 1999). Daher sollte untersucht werden, ob neu importiertes Rip1 eine nachweisbare Wechselwirkung mit BCS1 eingeht.

3.2.1 Analyse der Rip1-Assemblierung mithilfe von Deletionsmutanten

Um die Assemblierung von neu importiertem Rip1 nachweisen zu können, wurde zunächst das Laufverhalten von endogenem Rip1 aus verschiedenen Hefestämmen in der Nativgelelektrophorese überprüft. Aus früheren Studien war bekannt, dass die Deletion von Bcs1 ($\Delta bcs1$) oder Cytochrom c_1 ($\Delta cyt1$) dazu führt, dass Rip1 nicht in den Komplex III der Atmungskette assembliert wird (Nobrega et al., 1992, Cruciat et al., 1999). Diese Ergebnisse konnten bei der Analyse von $\Delta bcs1$ - als auch $\Delta cyt1$ -Mitochondrien mittels Nativgelelektrophorese reproduziert werden (Abb. 3.6).

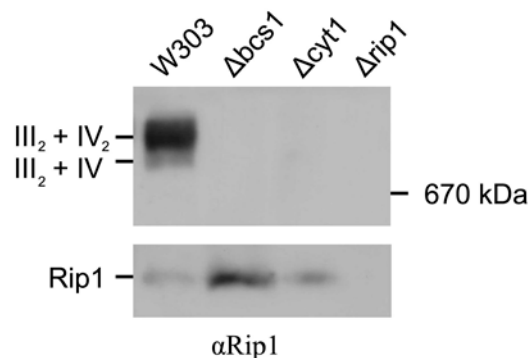


Abb. 3.6: Assemblierungszustand von Rip1 in Mitochondrien aus Wildtypzellen und Zellen, in denen Bcs1 ($\Delta bcs1$), Cytochrom c_1 ($\Delta cyt1$) und Rip1 ($\Delta rip1$) deletiert wurden.

Isolierte Mitochondrien wurden mit 3% (w/v) Digitonin lysiert und mittels Nativgelelektrophorese analysiert. In Wildtyp-Mitochondrien liegt Rip1 als Teil von respiratorischen Superkomplexen bestehend aus einem Homodimer von Komplex III (III_2) und einer (IV) oder zwei (IV_2) Kopien von Komplex IV der Atmungskette vor. In $\Delta bcs1$ - und $\Delta cyt1$ -Mitochondrien liegt Rip1 als niedermolekulare Spezies vor, die in der Lauffront gefunden wird. Als Negativkontrolle wurden Mitochondrien verwendet, die kein Rip1 enthalten ($\Delta rip1$).

In den Mitochondrien aus $\Delta bcs1$ - und $\Delta cyt1$ -Zellen liegt Rip1 nicht als Teil von Komplex III in Superkomplexen ($III_2 + IV$ und $III_2 + IV_2$) vor, sondern als niedermolekulare Spezies. Diese Spezies findet sich bei der Nativgelelektrophorese in der Lauffront (Abb. 3.6). Es ist wahrscheinlich, dass es sich dabei um ein Rip1-Monomer handelt.

3.2.2 Die Assemblierung von Rip1 kann in isolierten Mitochondrien nachvollzogen werden

Die geschilderten Beobachtungen zeigen, dass sich mittels Nativgelelektrophorese die Assemblierung von Rip1 nachweisen lässt. Dies war eine wichtige Voraussetzung für die Etablierung eines *in organello*-Systems. Da in früheren Studien nie eine stabile Wechselwirkung zwischen BCS1 und Rip1 gezeigt werden konnte, lag die Vermutung nahe, dass die physiologische BCS1-Rip1-Wechselwirkung kurz nach dem Import von Rip1 in Mitochondrien stattfinden und schnell wieder gelöst wird.

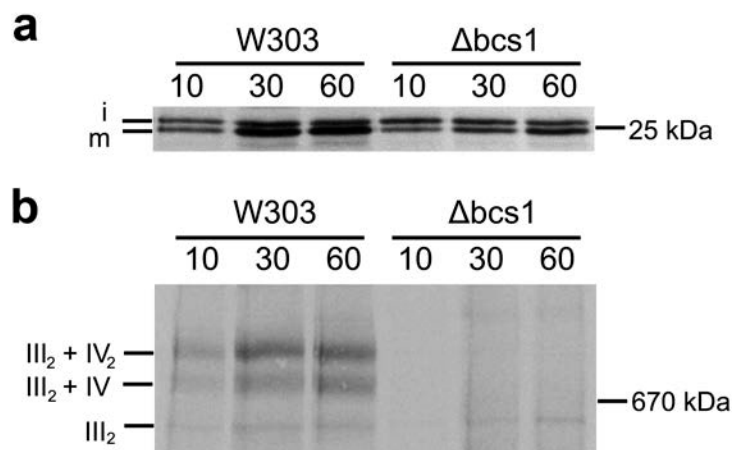


Abb. 3.7: Untersuchung der Rip1-Biogenese in isolierten Mitochondrien

Radioaktiv markiertes Rip1 wurde für 10, 30, oder 60 min in isolierte Mitochondrien aus einem Wildtypstamm (W303) oder einem $\Delta bcs1$ -Stamm importiert. SDS-Gelelektrophorese der mitochondrialen Proben (a) zeigte, dass Rip1 nach dem Import in einer intermediären (i) und einer maturierten (m) Form vorliegt. Mittels Nativgelelektrophorese und Autoradiographie (b) wurde die Assemblierung von Rip1 in ein Homodimer von Komplex III (III_2) und respiratorische Superkomplexe aus Komplex III (III_2) und einer (IV) oder zwei (IV_2) Kopien von Komplex IV der Atmungskette nachgewiesen.

Um diese Importreaktion und nachfolgende Schritte verfolgen zu können, wurden isolierte Mitochondrien mit Retikulozytenlysat inkubiert, das radioaktiv markiertes Rip1 enthielt. Nach 10, 30 und 60 min wurden Proben aus dem Reaktionsansatz entnommen und mittels denaturierender und nativer Gelelektrophorese analysiert. Es zeigte sich, dass in Wildtypmitochondrien importiertes Rip1 (Abb. 3.7a) erst mit zeitlicher Verzögerung in die respiratorischen Superkomplexe (Abb. 3.7b) eingebaut wurde. In $\Delta bcs1$ -Mitochondrien konnte radioaktiv markiertes Rip1 mit ähnlich guter Effizienz wie in Wildtypmitochondrien importiert werden, es wurde aber kein Einbau von Rip1 in Superkomplexe beobachtet. Die Rip1-Assemblierung folgt also in isolierten Mitochondrien demselben BCS1-abhängigen Weg wie in den Experimenten mit Mitochondrienlysaten und angereichertem BCS1.

3.2.3 Nachweis der Wechselwirkung zwischen Rip1 und BCS1 in Wildtyp-Mitochondrien

Um zu überprüfen, ob neu importiertes Rip1 während seiner Assemblierung tatsächlich mit BCS1 interagiert, wurde radioaktiv markiertes Rip1 in isolierte Mitochondrien importiert, die His₆-markiertes BCS1 enthielten (Abb. 3.8).

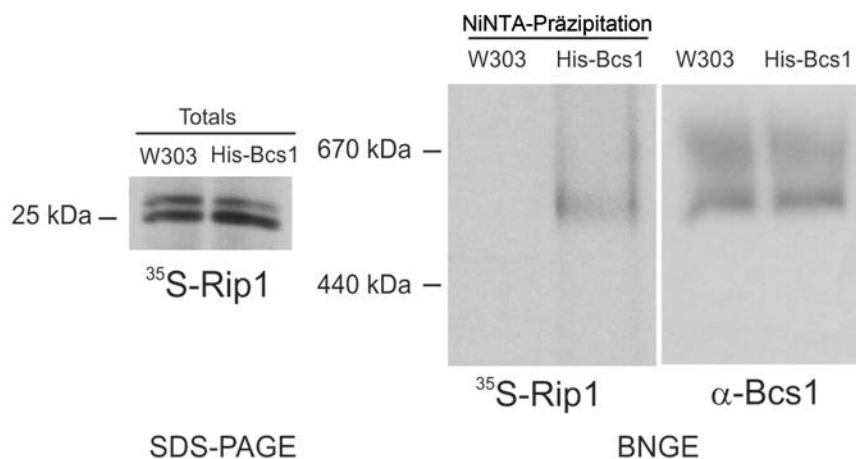


Abb. 3.8: Wechselwirkung von BCS1 mit Rip1 in isolierten Mitochondrien

Radioaktiv markiertes Rip1 (³⁵S-Rip1) wurde für 20 min bei 15°C in isolierte Mitochondrien aus einem Wildtypstamm (W303) und einem Stamm mit His₆-markiertem Bcs1 (His-Bcs1) importiert. Nach der Importreaktion wurde His-BCS1 chromatographisch an Nickelnitrilotriacetat (NiNTA) gebunden, um die Elutionsfraktion mittels Nativgelelektrophorese und Autoradiographie bzw. Western Blot zu analysieren. Ein autoradiographisches Rip1-Signal wurde nur bei den Proben mit His-Bcs1, nicht aber bei der Wildtypkontrolle ohne His₆-markiertes Protein beobachtet. Die Immundekoration von Bcs1 zeigte gleiche Signalintensität bei der Wildtypkontrolle und den Mitochondrien, die His₆-markiertes Bcs1 enthielten.

Wenn radioaktiv markiertes Rip1 bei erniedrigter Temperatur (15°C) in His-Bcs1-exprimierenden Mitochondrien importiert wurde, konnte mithilfe einer affinitätschromatographischen Aufreinigung, Rip1 spezifisch mit His-BCS1 angereichert werden (Abb. 3.8). Eine unspezifische Bindung von Rip1 an das chromatographische Trägermaterial (Nickelnitrilotriacetat) wurde ausgeschlossen, weil Rip1 nicht mit Wildtypmitochondrien mitisoliert wurde.

Mit diesem Versuch sollte der Weg verfolgt werden, den das neu importierte Rip1 nimmt. Zunächst wurde radioaktiv markiertes Rip1 wieder bei niedriger Temperatur (15°C) für 20 min importiert und ein Aliquot aus der Reaktion entnommen. Anschließend wurde die Temperatur auf 25°C erhöht und ATP erneut zugegeben. Nach 20 min wurde ein weiteres Aliquot entnommen. Beide Proben wurden geteilt und mit denaturierender und nativer Gelelektrophorese analysiert. In dem Maße, wie Rip1 von His-BCS1 gelöst wurde, erschien es in respiratorischen Superkomplexen (Abb. 3.9). Damit gelang der Nachweis, dass die physiologische Interaktion zwischen BCS1 und Rip1 transient ist und der Assemblierung von Rip1 in Superkomplexe der Atmungskette vorangeht.

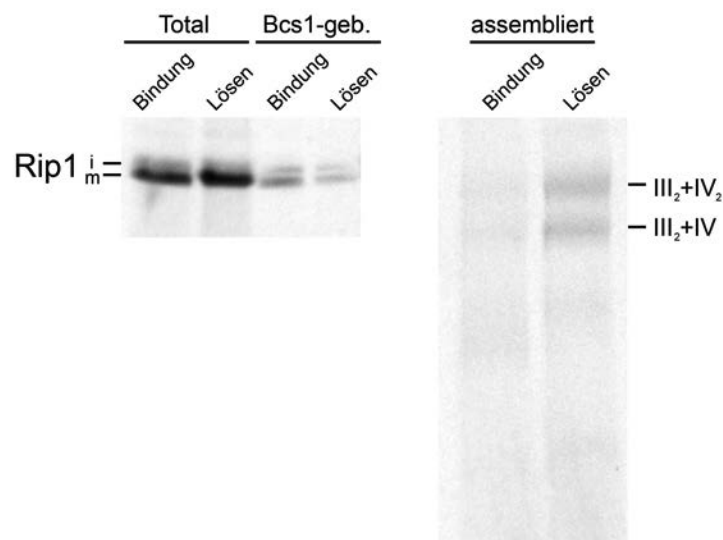


Abb. 3.9: Nachweis der ATP-abhängigen Wechselwirkung von BCS1 mit Rip1 in isolierten Mitochondrien

Radioaktiv markiertes Rip1 wurde wie in Abb. 3.8 beschrieben in isolierte Mitochondrien aus einem Stamm ($\Delta bcs1$ -Hintergrund) mit His₆-markiertem Bcs1 (His-Bcs1) importiert (Bindung). Nach der Importreaktion wurde die Temperatur auf 25°C erhöht und ATP (2 mM) zugegeben, um die Inkubation dann für weitere 20 Minuten fortzusetzen (Lösen). His-BCS1 wurde chromatographisch angereichert, um die Elutionsfraktion mittels Gelelektrophorese und Autoradiographie zu analysieren. Die SDS-Gelelektrophorese (links) zeigte intermediäre (i) und maturierte (m) Rip1-Formen (vergl. Abb. 3.7), die Nativgelelektrophorese (rechts) die Assemblierung von Rip1 in ein Homodimer von Komplex III (III₂) und respiratorische Superkomplexe (vergl. Abb. 3.7).

3.2.4 Nachweis der Wechselwirkung zwischen Rip1 und BCS1 in $\Delta cyt1$ -Mitochondrien

Wie in Kapitel 3.2.1 dargestellt, liegt Rip1 in $\Delta cyt1$ -Mitochondrien als niedermolekulare Spezies vor. Diese Spezies liegt in oder in Assoziation mit der Innenmembran vor und unterscheidet sich damit grundlegend von Rip1 in $\Delta bcs1$ -Mitochondrien, das in der Matrix auftritt. Diese Befunde unterstützen die Funktion von BCS1 als Translokase (s. Kapitel 1.3.2). Insbesondere übt BCS1 die Translokase-Funktion auch in $\Delta cyt1$ -Mitochondrien aus (Wagener et al., 2011). Die Tatsache, dass Rip1 in diesen Mitochondrien nicht in einem hochmolekularen Komplex vorgefunden wird, spricht dafür, dass es nach erfolgter Translokation aus dem BCS1-Komplex freigesetzt wird. Um dies experimentell zu bestätigen, wurde radioaktiv markiertes Rip1 bei 15°C in His-Bcs1-enthaltende Mitochondrien importiert. Die affinitätschromatographische Anreicherung von His-BCS1 zeigte, dass Rip1 an den BCS1-Komplex bindet und nach erneuter Zugabe von ATP und Erhöhung der Temperatur auf 25°C wieder gelöst wird (Abb. 3.10). Anders als in Wildtyp-Mitochondrien ist in Mitochondrien ohne Cytochrom c_1 ($\Delta cyt1$) kein Präkomplexes p-III vorhanden, der Rip1 aufnehmen kann. Rip1 wird in $\Delta cyt1$ -Mitochondrien also unabhängig vom Präkomplex transloziert und aus dem BCS1-Komplex freigesetzt.

Die Konzentrationen von Rip1 in $\Delta cyt1$ -Mitochondrien sind deutlich geringer als diejenigen in $\Delta bcs1$ -Mitochondrien (s. Kapitel 3.2.1, Abb. 3.6). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass Rip1 hier nicht durch den Präkomplex aufgenommen werden kann und deshalb besonders zugänglich für Proteasen ist.

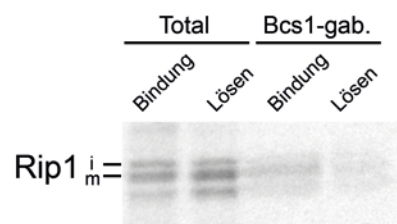


Abb. 3.10: Nachweis der ATP-abhängigen Wechselwirkung von BCS1 mit Rip1 in isolierten $\Delta cyt1$ -Mitochondrien

Radioaktiv markiertes Rip1 wurde wie in Abb. 3.9 beschrieben in isolierte Mitochondrien aus einem Stamm mit His₆-markiertem Bcs1 (His-Bcs1) in einem $\Delta cyt1$ -Hintergrund importiert (Bindung). Nach der Importreaktion wurde die Temperatur auf 25°C erhöht und ATP (2 mM) zugegeben und weitere 20 min inkubiert (Lösen). His-BCS1 wurde chromatographisch angereichert, um die Elutionsfraktion mittels Gelelektrophorese und Autoradiographie zu analysieren. Die SDS-Gelelektrophorese zeigte eine intermediäre (i) und eine maturierte (m) Rip1-Form (vergl. Abb. 3.7 und 3.9).

3.3 Identifizierung von Bereichen des Rip1-Proteins, die für die Wechselwirkung mit BCS1 erforderlich sind

3.3.1 Die N-terminale Transmembrandomäne von Rip1 spielt bei der Interaktion mit BCS1 eine entscheidende Rolle

Nachdem gezeigt worden war, dass Rip1 nach dem Import in Mitochondrien transient mit BCS1 interagiert, stellte sich die Frage, welche Bereiche von Rip1 diese Interaktion vermitteln. Deshalb wurde von Dr. N. Wagener eine für Rip1 generierte Peptid-Bibliothek eingesetzt, um diese Bereiche zu identifizieren. Dabei stellte sich heraus, dass ein Peptid, das die Aminosäuren 172-179 von Rip1 repräsentiert, mit BCS1 interagiert. Um die Rolle dieser Sequenz genauer zu untersuchen, wurde eine Rip1-Variante hergestellt, bei der die genannten Aminosäurereste durch acht Alaninreste ersetzt wurden. Diese Variante (Rip1-A-stretch) wurde in *E.coli* exprimiert, um sie auf eine mögliche Interaktion mit BCS1 hin zu untersuchen. Parallel dazu wurden drei weitere Rip1-Varianten (Abb. 8a) verwendet: Zwei Varianten (Rip1₆₁₋₂₁₅ und Rip1₉₁₋₂₁₅) waren N-terminal, eine (Rip1₃₁₋₁₂₃) C-terminal verkürzt. Die Sequenzen der C-terminal verkürzten Variante (Rip1₃₁₋₁₂₃) und der Rip1-A-stretch-Variante begannen mit Aminosäure 31 des Rip1-Vorläuferproteins, so dass sie dem proteolytisch prozessierten Rip1 entsprachen, das in Mitochondrien vorgefunden wird. Die anderen beiden Varianten waren N-terminal verkürzt und begannen mit Aminosäurerest 61 bzw. 91. Als Positivkontrolle wurde das bereits in Kapitel 3.1.2.1 (Abb. 3.3) eingeführte Vollängen-Rip1 (Rip1₃₁₋₂₁₅) verwendet. Mithilfe des in Kapitel 3.1.2.1 beschriebenen Bindeassays sollte nun untersucht werden, welche dieser Rip1-Formen an den BCS1-Komplex binden und so zu einem veränderten Laufverhalten des Komplexes in der Nativgelelektrophorese führen kann. Interessanterweise wurde keine Bindung der N-terminal verkürzten Varianten (Rip1₆₁₋₂₁₅ und Rip1₉₁₋₂₁₅) an BCS1 beobachtet (Abb. 3.11b). Dagegen wurde sowohl bei Rip1-A-stretch als auch bei dem C-terminal verkürzten Rip1 (Rip1₃₁₋₁₂₃) eine Bindung festgestellt. Dies war sowohl mit lysierten Mitochondrien als auch mit angereichertem His-BCS1 zu beobachten (Abb. 3.11b). Überraschenderweise scheint *in vitro* somit der N-terminale Bereich von Rip1 eine wichtige Rolle für die Interaktion mit BCS1 zu spielen.

Parallel wurden die Rip1-Varianten in Retikulozytenlysat radioaktiv markiert, um sie in dem in Kapitel 3.2.3 beschriebenen Experiment mit isolierten Mitochondrien zu untersuchen. Radioaktiv markiertes Rip1-A-stretch und Rip1₃₁₋₁₂₃ konnten nach einer Importreaktion nicht mit His-BCS1 angereichert werden (Abb. 3.11c). Dagegen wurden Rip1₆₁₋₂₁₅ und Rip1₉₁₋₂₁₅ in Assoziation mit His-BCS1 gefunden (Abb. 3.11c). Diese Experimente scheinen zunächst im Widerspruch zu den Befunden der Versuche mit lysierten Mitochondrien und angereichertem BCS1 zu stehen, in denen Rip1-A-stretch und Rip1₃₁₋₁₂₃ an BCS1 gebunden hatten.

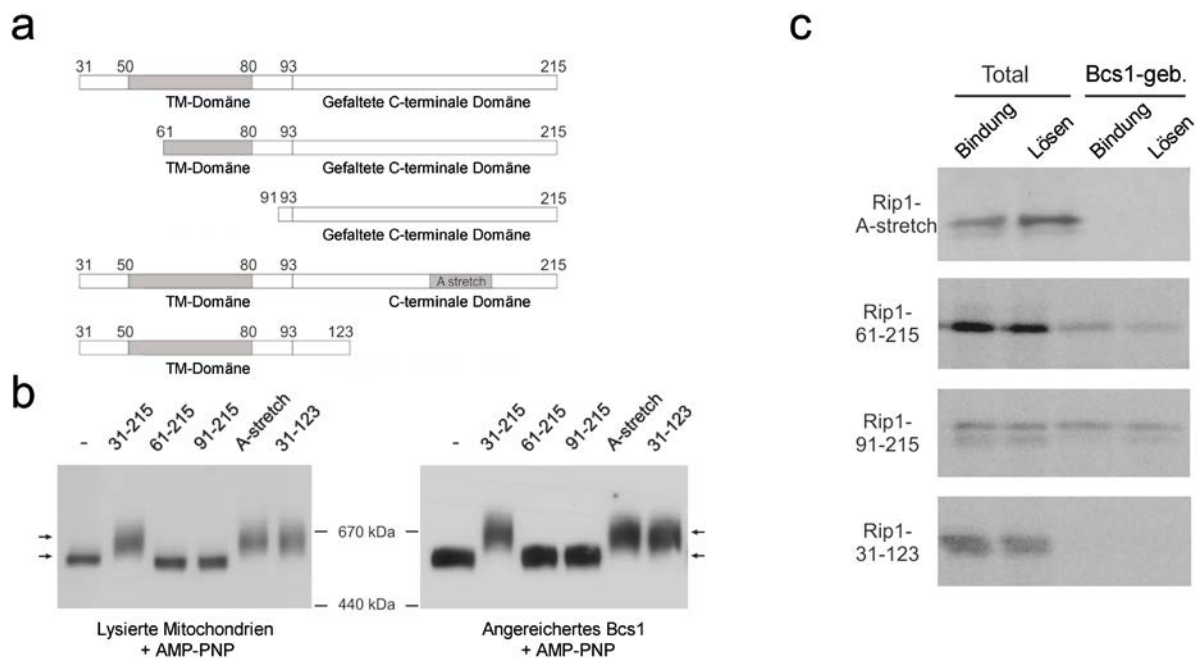


Abb. 3.11: Wechselwirkung von BCS1 mit Rip1-Varianten in lysierten und intakten Mitochondrien

a) Das maturierte Rip1-Protein beginnt mit Aminosäurerest 31 des Vorläuferproteins und enthält eine Transmembrandomäne und eine gefaltete C-terminale Domäne. Untersucht wurden Rip1-Varianten mit N-terminalen Verkürzungen (Rip1₆₁₋₂₁₅ und Rip1₉₁₋₂₁₅) oder C-terminaler Verkürzung (Rip1₃₁₋₁₂₃). Außerdem wurde eine Rip1-Variante untersucht, bei der die Aminosäurereste 172-179 durch Alaninreste ersetzt sind (*A-stretch*). Diese Varianten wurden in Mitochondrienlysaten oder mit dem angereicherten BCS1 (b, vergl. Abb. 3.3) und in intakten Mitochondrien (c, vergl. Abb. 3.9) untersucht.

3.3.2 Die Faltung des Rip1-Proteins ist Voraussetzung für die Wechselwirkung mit BCS1 in intakten Zellen

3.3.2.1 Mutation der C-terminalen Domäne von Rip1 beeinträchtigt die Faltung

Um die offenbare Diskrepanz zwischen den Ergebnissen in der Analyse der Interaktion von Rip1 mit BCS1 zu verfolgen, wurden die untersuchten Rip1-Varianten in Hefezellen exprimiert, in denen Rip1 deletiert war. Allerdings stellte sich heraus, dass nur Rip1-*A-stretch* stabil exprimiert werden konnte.

Die Rip1-*A-stretch*-Mutante wurde nicht wie Rip1 im Wildtyp in respiratorischen Superkomplexen vorgefunden, sondern als Monomer (Abb. 3.12). Wie bereits bei der Untersuchung der $\Delta bcs1$ - und $\Delta cyt1$ -Stämme beobachtet (vergl. Kapitel 3.2.1, Abb. 3.6), wurde Rip1 in der Nativgelelektrophorese in der Lauffront detektiert. Allerdings stellte sich heraus, dass sich die verschiedenen Monomere hinsichtlich ihrer Resistenz gegen Protease-Behandlung unterscheiden.

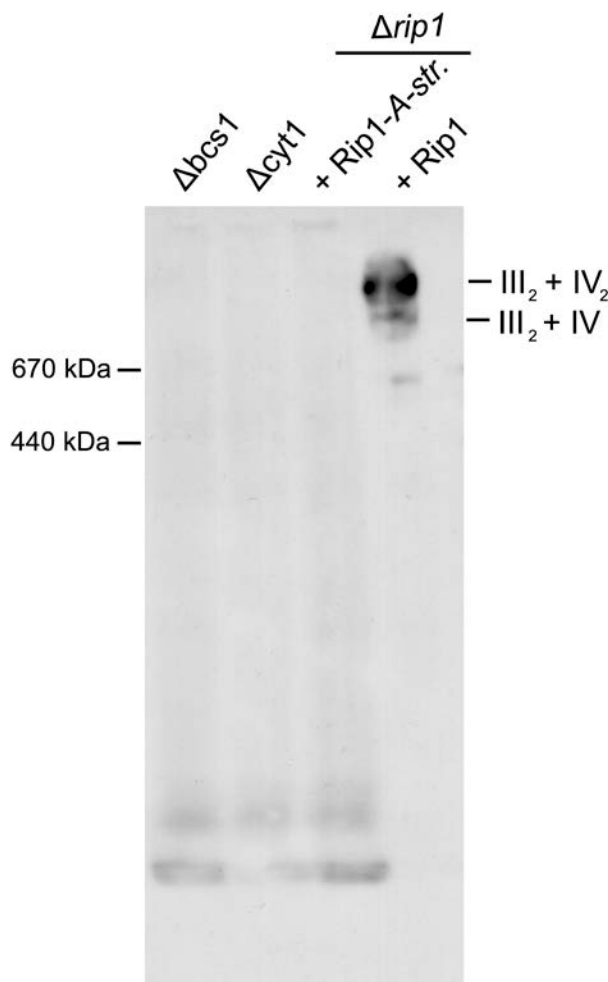


Abb. 3.12: Assemblierungszustand der Rip1-*A-stretch*-Mutante

Isolierte Mitochondrien wurden mit Digitonin lysiert und mittels Nativgelelektrophorese analysiert. In $\Delta bcs1$ - und $\Delta cyt1$ -Mitochondrien liegt Rip1 als niedermolekulare Spezies vor. Ebenso wird Rip1-*A-stretch* in der Lauffront gefunden, wenn es in einem $\Delta rip1$ -Hintergrund exprimiert wird. Wird Wildtyp-Rip1 im $\Delta rip1$ -Hintergrund exprimiert, findet es sich als Teil von respiratorischen Superkomplexen aus einem Homodimer von Komplex III (III_2) und einer (IV) oder zwei (IV_2) Kopien von Komplex IV der Atmungskette.

$\Delta bcs1$ - oder $\Delta cyt1$ -Mitochondrien wurden nach Lyse mit Puffer, der SDS enthielt (15 mg SDS/ 0,6 mg mitochondriales Protein), mit Proteinase K behandelt. Dabei blieb ein stabiles Rip1-Fragment zurück (Abb. 3.13). Dieses Fragment wurde vollständig verdaut, wenn die SDS-Konzentration fünffach erhöht wurde (75 mg SDS/ 0,6 mg mitochondriales Protein). Da der eingesetzte Antikörper den C-Terminus von Rip1 erkennt, stellt das beschriebene Fragment die gefaltete C-terminale Domäne dar. In Mitochondrien aus Rip1-*A-stretch*-exprimierenden Zellen wurde keine Proteinase K-resistente C-terminale Domäne beobachtet (Abb. 3.13). Rip1-*A-stretch* kann scheinbar keine stabile Faltung ausbilden.

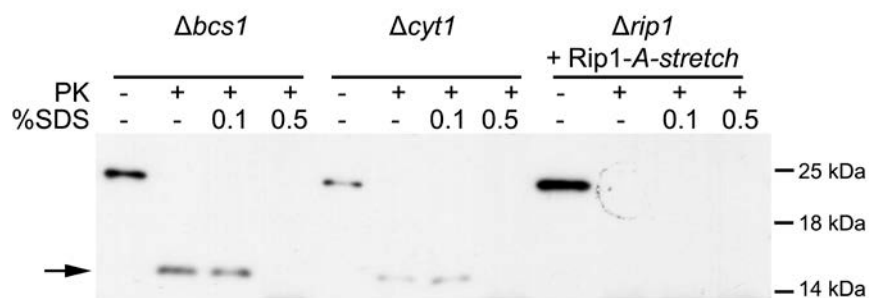


Abb. 3.13: Untersuchung der Protease-Resistenz von Rip1

Isolierte Mitoplasten wurden in Abwesenheit oder Gegenwart geringer Mengen SDS mit Proteinase K (PK) behandelt. In Ansätzen aus $\Delta bcs1$ - und $\Delta cyt1$ -Mitochondrien konnte ein Protease-resistentes Rip1-Fragment von ca. 15 kDa (Pfeil) nachgewiesen werden. Dieses Fragment war in Ansätzen mit Rip1-*A-stretch* ($\Delta rip1$ -Hintergrund) nicht nachweisbar.

3.3.2.2 Der C-terminale Bereich von Rip1 ist wichtig für die Faltung

Die Rolle der Faltung der C-terminalen Domäne von Rip1 für die Interaktion mit BCS1 sollte im Folgenden untersucht werden. Eine nähere Analyse der Strukturdaten von Komplex III aus Hefe (Hunte et al., 2000) zeigte, dass die genannte Erkennungssequenz auf der Oberfläche der gefalteten C-terminalen Domäne exponiert ist. Da Rip1-*A-stretch* nach Import in die mitochondriale Matrix nicht in Wechselwirkung mit BCS1 treten konnte (s. Kapitel 3.3.1, Abb. 3.11c), ergibt sich die Frage, ob die Erkennungssequenz die Interaktion auch dann vermittelt, wenn die C-terminale Domäne nicht gefaltet ist. Im Weiteren sollten deshalb Rip1-Varianten gefunden werden, die entfaltet sind, die Erkennungssequenz aber tragen.

Wie ein Vergleich der Sequenzen verschiedener Spezies zeigte, weist der C-terminale Bereich von Rip1 eine stark konservierte Sequenz auf (Abb. 3.14). Den Strukturdaten (Hunte et al., 2000) zufolge bilden die Aminosäuren 211 bis 214 ein β -Faltblatt aus (Abb. 3.15). Zusammen mit Segmenten, die in der Primärstruktur weiter N-terminal lokalisiert sind, bildet der C-Terminus ein β -Sandwich aus, wobei die Aminosäurereste 211 bis 214 das mittlere β -Faltblatt darstellen. Um zu untersuchen, ob die Deletion des C-terminalen β -Strangs die Faltung der gesamten Domäne beeinträchtigt, wurden fünf Rip1-Varianten mit kurzen C-terminalen Deletionen in Hefe ($\Delta rip1$ -Hintergrund) episomal exprimiert: Rip1₁₋₂₁₄, Rip1₁₋₂₁₁, Rip1₁₋₂₀₉, Rip1₁₋₂₀₅ und Rip1₁₋₂₀₀.

Mitochondriale Rieske-Sequenzen

	200	210
	
<i>S. cerevisiae</i>	PLNLEIPAYEF-DGDKVIVG	
<i>N. crassa</i>	PLNLEIPLYEFPEEGKLVIG	
<i>D. discoideum</i>	PMNLIVPPYKFITSDKIIVG	
<i>C. elegans</i>	PLNLHVPAYSF-KDATIVIG	
<i>D. melanogaster</i>	PLNLEVPTHEFPNEGLLVVG	
<i>X. laevis</i>	PLNLEVPEYEFPSEDLVIVG	
<i>M. musculus</i>	PLNLEVPAYEFTSDDVVVVG	
<i>B. taurus</i>	PLNLEVPSYEFTSDDMVIVG	
<i>H. sapiens</i>	PLNLEVPTYEFTSDDMVIVG	
<i>C. reinhardtii</i>	PYNLEVPEYRFTTEGQKVVIG	
<i>A. thaliana</i>	PYNLEVPTYSFLEENKLLIG	
<i>O. sativa</i>	PVKIDGENIYISIKGAVTSG	
<i>Z. mays</i>	PLNLEIPAYDFPEEGKVVIG	

Chloroplastidäre Rieske-Sequenzen

<i>C. reinhardtii</i>	PLSLALAHCDVAESGLVTFS
<i>A. thaliana</i>	PLSLALAHADIDEAGKVLFFV
<i>O. sativa</i>	PLSLALVHADVDD-GKVLFFV
<i>Z. mays</i>	PLSLALVHADVDD-GKVLFFV

Abb. 3.14: Vergleich von C-terminalen Sequenzen von Rieske-Proteinen aus Mitochondrien und Chloroplasten verschiedener Spezies

Die Aminosäuren sind entsprechend ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften farbkodiert: rot steht für saure (E,D), dunkelblau für basische (K, R), grün für aliphatische (M,V,I,L), hellblau für alkoholische (T,S), dunkeltürkis für aromatische (Y,F) Reste. Weiter steht helltürkis für Alanin (A), blau für Asparagin und Glutamin (N,Q), dunkelrot für Cystein (C), gelb für Glycin (G), pink für Histidin (H), grau für Prolin (P).

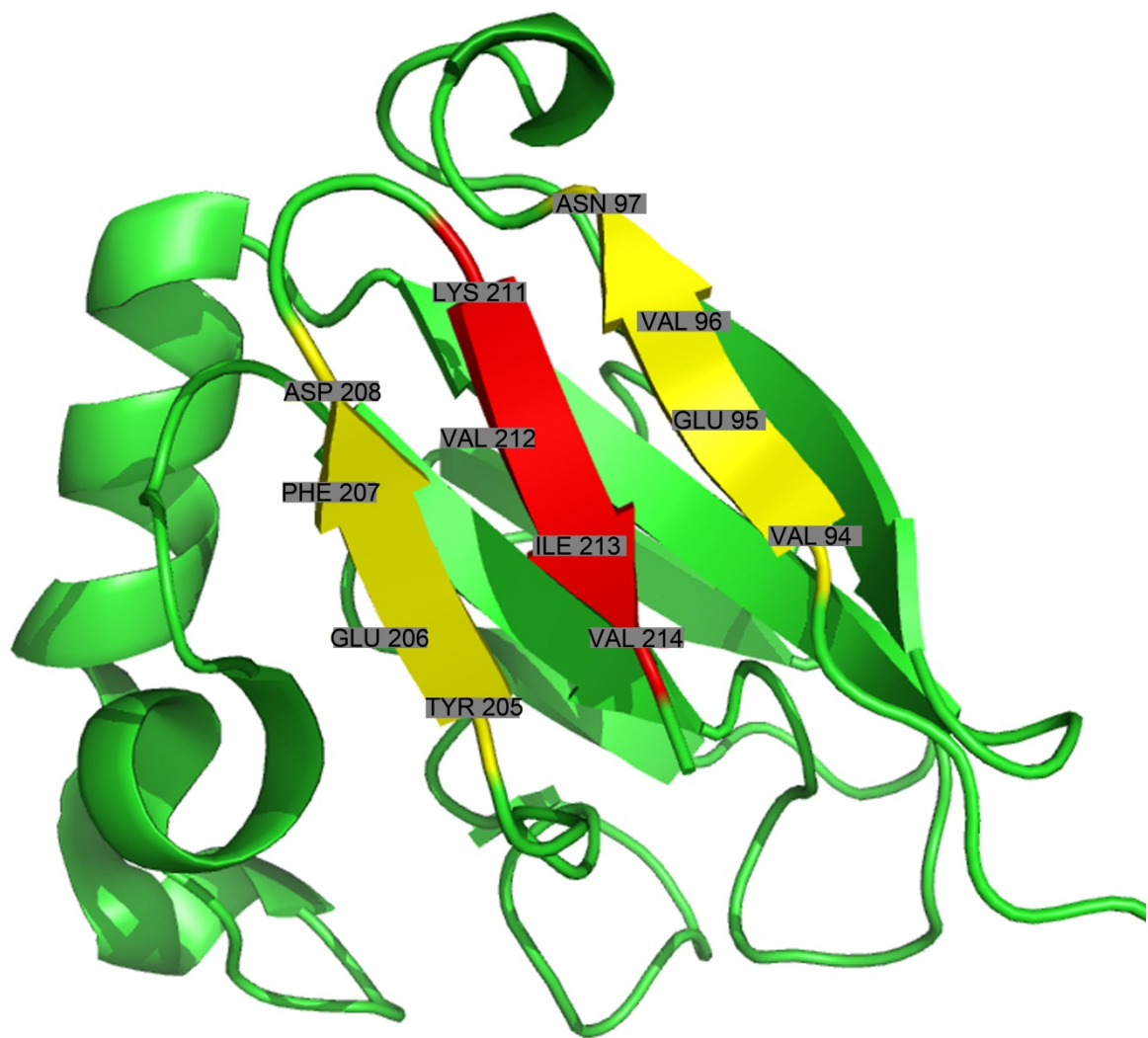


Abb. 3.15: Struktur des C-Terminus von Rip1

Die C-terminalen Aminosäurereste 211-214 bilden einen β -Faltblatt (rot) aus, das Teil eines β -Sandwiches (gelb und rot) ist.

Die Expression von Rip1-Varianten mit einer Deletion von sechs oder mehr Aminosäureresten (Rip1₁₋₂₀₉, Rip1₁₋₂₀₅ und Rip1₁₋₂₀₀) führte zu einem Phänotyp mit Atmungsdefizit. Die entsprechenden Stämme konnten nicht auf obligat aeroben Kohlenstoffquellen (z.B. Glycerin) wachsen (Abb. 3.16). Diese Varianten konnten die Deletion des endogenen Rip1 ($\Delta rip1$) nicht komplementieren. Wie nähere Untersuchungen zeigten, ermöglichte die Expression von Rip1₁₋₂₁₁ die Verwertung von Glycerin als Kohlenstoffquelle zwar, führte aber dennoch zu Beeinträchtigungen (Abb. 3.17a). Im Vergleich zu Stämmen mit Wildtyp-Rip1 oder Rip1₁₋₂₁₄ wurden verringerte Wachstumsraten verzeichnet. In dem Maße wie bei diesen Varianten der C-Terminus mehr und mehr verkürzt war, verschlechterte sich auch ihre Fähigkeit, bei erniedrigter Temperatur (24°C) auf Glukose zu wachsen (Abb. 3.18). Diese Beobachtungen zu den einzelnen Phänotypen deuteten darauf hin, dass die Länge der Verkürzung direkt mit dem Ausmaß des Wachstumsdefizits korreliert ist.

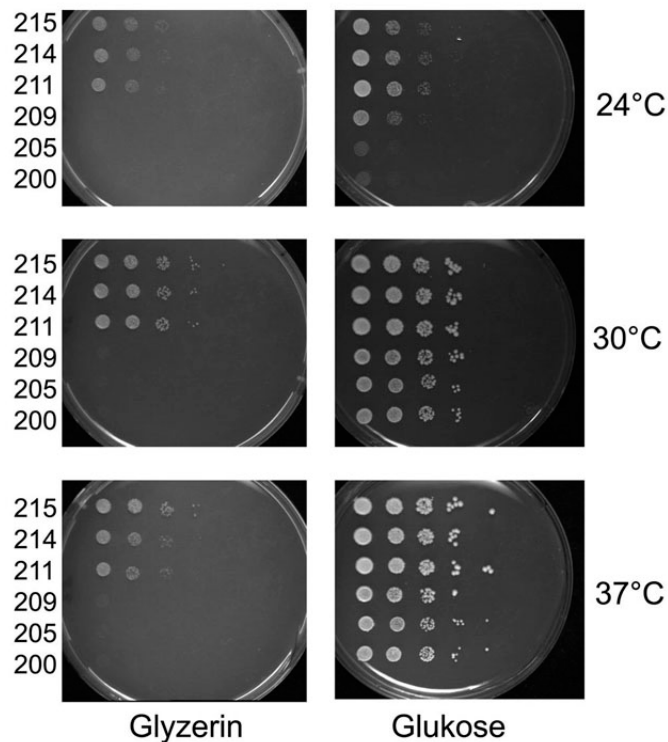


Abb. 3.16: Komplementation der Rip1-Deletion durch Expression C-terminal verkürzter Rip1-Varianten

C-terminal verkürzte Rip1-Varianten wurden in einem $\Delta rip1$ -Hintergrund exprimiert. Die Zellen wurden zunächst in Flüssigmedium angezogen und dann auf Glycerin- bzw. Glukosehaltige Platten aufgebracht. Hierzu wurden die Zellsuspensionen (Ausgangskonzentration 0,5 OD₆₀₀/ ml) seriell verdünnt (Verdünnungsfaktor 10 von links nach rechts). Die Platten wurden für zwei Tage bei den angegebenen Temperaturen inkubiert.

Zwar waren alle Rip1-Varianten in gleichen Mengen in Mitochondrien exprimiert, aber nur Rip1₁₋₂₁₅, Rip1₁₋₂₁₄ und Rip1₁₋₂₁₁ wurden nach Analyse mittels Nativgelelektrophorese als Komponenten von respiratorischen Superkomplexen gefunden (Abb. 3.17b). In einem Experiment mit isolierten Mitochondrien konnte gezeigt werden, dass Rip1-Varianten mit einer Deletion von sechs Aminosäuren (Rip1₁₋₂₀₉) oder mehr (Rip1₁₋₂₀₅) nicht an BCS1 binden (Wagener et al., 2011).

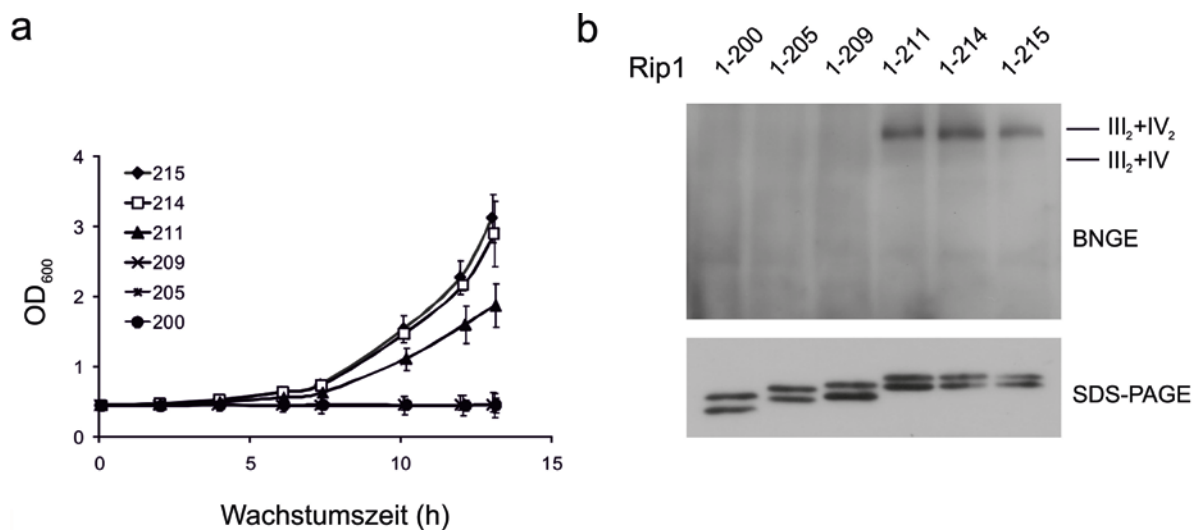


Abb. 3.17: Wachstumsphänotyp und Assemblierungszustand von C-terminal verkürzten Rip1-Varianten

C-terminal verkürzte Rip1-Varianten wurden in einem $\Delta rip1$ -Hintergrund exprimiert.

- Die Zellen wurden in Flüssigmedium mit Glycerin (YPG) angezogen. In regelmäßigen Abständen wurde die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) bestimmt. Die Balken repräsentieren die Standardabweichung ($n = 3$).
- Isolierte Mitochondrien wurden mit 3% (w/v) Digitonin lysiert und mittels Nativgelelektrophorese (oben) und SDS-Gelelektrophorese (unten) analysiert. Rip1 wurde mithilfe von Immunodekoration sichtbar gemacht. Die Doppelbanden repräsentieren jeweils die intermediäre bzw. maturierte Form von Rip1.

Nun stellte sich noch die Frage, ob die Faltung der C-terminalen Domäne bei diesen Varianten tatsächlich beeinträchtigt war. In der Tat erhielt man nur beim Verdau von Rip1₁₋₂₁₄ und Rip1₁₋₂₁₁ ein 15kDa-Fragment, das resistent gegen Behandlung mit Proteinase K ist (Abb. 3.18). Damit waren die gesuchten Rip1-Varianten mit Faltungsdefizit gefunden.

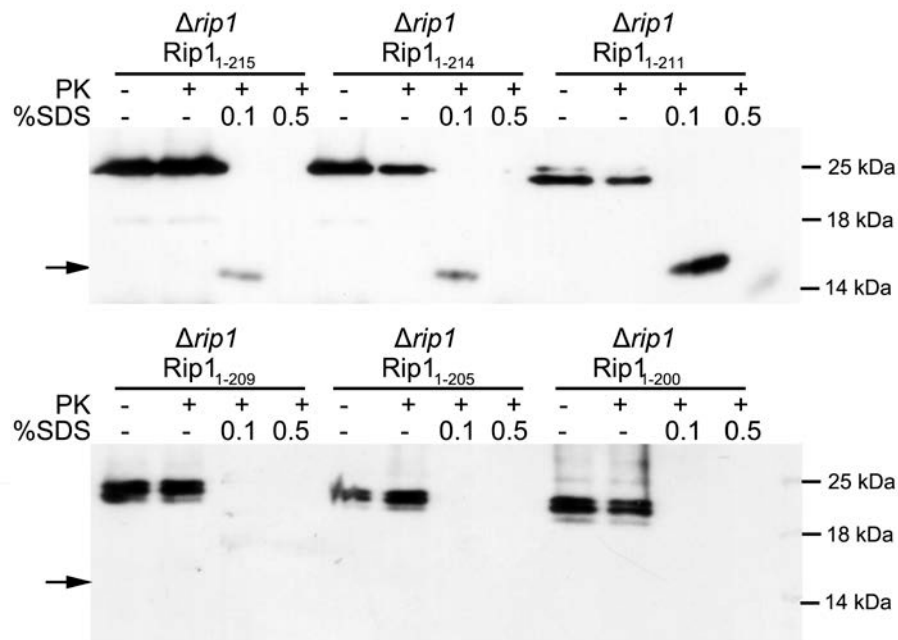


Abb. 3.18: Protease-Resistenz von C-terminal verkürzten Rip1-Varianten

C-terminal verkürzte Rip1-Varianten wurden in einem $\Delta rip1$ -Hintergrund exprimiert. Isolierte Mitoplasten wurden in Abwesenheit oder Gegenwart geringer Mengen SDS mit Proteinase K (PK) behandelt. Ein Protease-resistentes Rip1-Fragment von ca. 15 kDa (Pfeil) konnte nur bei Rip1₁₋₂₁₅, Rip1₁₋₂₁₄ und Rip1₁₋₂₁₁ nachgewiesen werden.

3.3.2.3 BCS1 trägt zwei Erkennungsstellen für Rip1

Die in den Experimenten mit lytierten Mitochondrien oder angereichertem BCS1 untersuchten Rip1-Varianten unterschieden sich von denjenigen, die in isolierten Mitochondrien oder intakten Zellen untersucht wurden, vor allem in Bezug darauf, ob sie denaturiert oder nativ vorlagen. Im ersten Fall wurden Rip1-Varianten denaturierend aus *E. coli* aufgereinigt, im zweiten wurde natives Rip1 verwendet, das je nach Variante gefaltet oder entfaltet (Rip1-A-stretch oder C-terminal verkürzte Varianten) vorlag. Um natives und denaturiertes Rip1 in einem Experiment parallel zu untersuchen, wurde eine His₆-markierte Rip1-Variante episomal im $\Delta rip1$ -Hintergrund exprimiert. Das Protein wurde in parallelen Ansätzen nativ und denaturierend angereichert. Inkubation mit dem nativ angereicherten Rip1 führte nicht zu

einer Veränderung des Laufverhaltens von BCS1 im Nativgel (Abb. 3.19). Im Gegensatz dazu änderte sich das Laufverhalten von BCS1 in Gegenwart des denaturierend angereicherten Rip1 (Abb. 3.19) wie in den Experimenten mit denaturiertem Rip1 aus *E. coli* (s. Kapitel 3.1.2). Daraus ergab sich die Frage, ob das nativ angereicherte Rip1 überhaupt an BCS1 bindet.

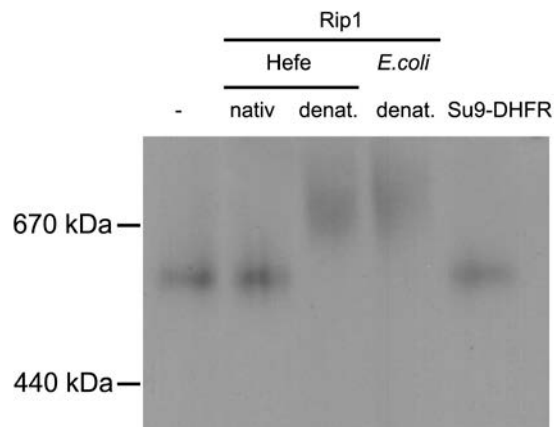


Abb. 3.19: Wechselwirkung von BCS1 mit His-Rip1 aus Hefe

Die elektrophoretische Mobilität von BCS1 im Nativgel wurde mit Mitochondrienlysaten wie in Abb. 3.3 erläutert untersucht. Zusätzlich wurde aus Hefe angereichertes His-Rip1 in nativer und denaturierter Form verwendet.

Diese Frage konnte nicht mit der beschriebenen Rip1-Variante geklärt werden, da die Untersuchung einer spezifischen Bindung an His-BCS1 nur mit einer unmarkierten Variante möglich war. Aus diesem Grund sollten endogene Rip1-Varianten zum Einsatz kommen, die durch Lyse der entsprechenden Mitochondrien experimentell gewonnen werden können. Dies trifft auf Rip1, das im Komplex III assembliert ist, nicht zu, da es selbst bei hohen Digitonin-Konzentrationen nicht aus dem Proteinkomplex gelöst wird. Daher wurde Rip1 aus $\Delta bcs1$ -Mitochondrien verwendet, wo es als gefaltetes Monomer in der Matrix vorliegt.

In Übereinstimmung mit den zuvor beschriebenen Resultaten verursachte diese Form des Rip1-Proteins keine Änderung der Laufgeschwindigkeit von BCS1 im Nativgel (Abb. 3.20).

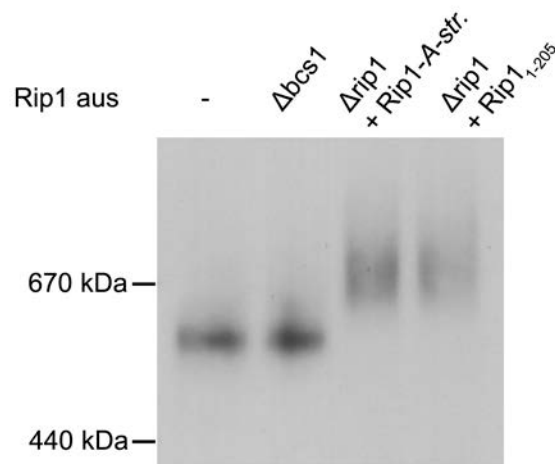


Abb. 3.20: Konformationsänderung von BCS1 durch Wechselwirkung mit Rip1-Varianten

His-BCS1 wurde mit Lysat von $\Delta bcs1$ -Mitochondrien, das gefaltetes, nicht-assembliertes Rip1 enthielt, oder mit Lysat von $\Delta rip1$ -Mitochondrien mit episomal exprimiertem Rip1-A-stretch bzw. Rip1₁₋₂₀₅ inkubiert und anschließend chromatographisch angereichert. Die elektrophoretische Mobilität des angereicherten His-BCS1 im Nativgel wurde wie in Abb. 3.3 erläutert untersucht.

Rip1-A-stretch und Rip1₁₋₂₀₅ dienten hier als Positivkontrollen, mit denen die Ergebnisse aus Kapitel 3.3.1 rekapituliert werden sollten (Abb. 3.11b). Anders als Rip1 in $\Delta bcs1$ -Mitochondrien, liegen diese Varianten (Rip1-A-stretch und Rip1₁₋₂₀₅) in entfalteter Form vor (s. Kapitel 3.3.2.1 und 3.3.2.2) und waren in dieser Hinsicht äquivalent zu den denaturierend aus *E. coli* angereicherten Rip1-Varianten, die ebenfalls die Laufgeschwindigkeit von BCS1 verändert hatten (s. Kapitel 3.3.1, Abb. 3.11b).

Durch SDS-Gelelektrophorese sollte untersucht werden, ob die Rip1-Varianten mit dem His₆-markierten BCS1 bei einer chromatographischen Aufreinigung mitangereichert werden können. Als Negativkontrolle wurde das Lysat von His₆-BCS1-exprimierenden Mitochondrien verwendet. Endogenes Rip1 aus diesem Ansatz (Abb. 3.21, Spur „-“) wurde nicht mit His-Bcs1 angereichert. Damit war sichergestellt, dass His-BCS1 nicht durch endogenes Rip1 blockiert war, bevor die Rip1-Varianten zugegeben wurden. Dagegen konnten sowohl Rip1 aus $\Delta bcs1$ -Mitochondrien, Rip1-A-stretch und Rip1₁₋₂₀₅ an His-BCS1 binden und spezifisch mit dem Komplex angereichert werden (Abb. 3.21). Damit war gezeigt, dass Rip1 *in vitro* auch dann an BCS1 bindet, wenn es über eine gefaltete C-terminale Domäne verfügt. Allerdings führt diese Bindung nicht zu einer Konformationsänderung (Abb. 3.19 und Abb. 3.20). Für diese Konformationsänderung scheint die Bindung durch das N-terminale Segment von Rip1 unerlässlich (s. Kapitel 3.3.1, Abb. 3.11b).

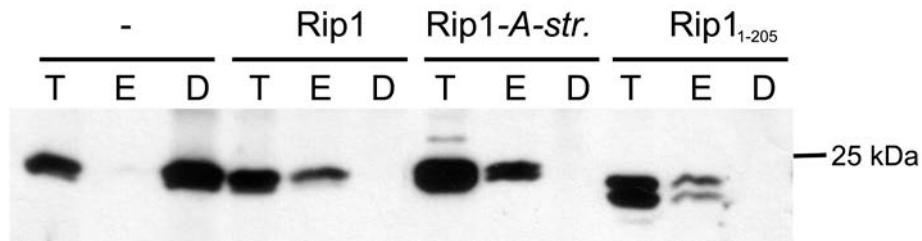


Abb. 3.21: Wechselwirkung von BCS1 mit gefalteten und entfalteten Rip1-Varianten

Isolierte Mitochondrien wurden mit 3% Digitonin lysiert. Mitochondrienlysate, die entweder Wildtyp-Rip1, Rip1-*A-stretch* oder Rip1₁₋₂₀₅ enthielten wurden mit Lysaten vereinigt, die His-Bcs1 enthielten. Diese Ansätze wurden 20 min bei 10°C inkubiert, dann wurde die Interaktion von BCS1 mit den verschiedenen Rip1-Formen mittels Nickelnitrilotriacetat-Affinitätschromatographie, SDS-Gelelektrophorese und Immunodekoration von Rip1 analysiert (Gesamtfraktion: T (20%), Elutionsfraktion: E, Durchflussfraktion: D).

3.4 Die Transmembrandomäne von Bcs1 spielt eine Rolle bei der Interaktion von BCS1 mit Rip1

Da BCS1 seine Konformation ändert, wenn es das N-terminale Transmembransegment von Rip1 bindet, sollte untersucht werden, welcher Bereich von Bcs1 für diesen Teilschritt der Translokation nötig ist. Bcs1 umfasst eine C-terminale AAA-Domäne, eine N-Linker-Region, zwei Signalsequenzen für den Import in die Mitochondrien (Aminosäuren 69-83 und 84-126), eine Transmembrandomäne (Aminosäuren 45-68) und einen N-terminalen Schwanz von 44 Aminosäuren (Abb. 3.22). Da das N-terminale Segment von Rip1 letztendlich in die Membran entlassen wird, lag die Vermutung nahe, die membrandurchspannenden Bereiche von Bcs1 könnten dabei eine Rolle spielen. Deshalb wurden verschiedene N-terminale Trunktationsmutanten von Bcs1 durch native Gelelektrophorese analysiert.



Abb. 3.22: Domänen der verwendeten Bcs1-Varianten mit N-terminalen Verkürzungen

Bcs1 weist eine Transmembrandomäne (TM), eine mitochondriale Signalsequenz (MSS), eine zusätzliche Importsequenz (ZIS) und eine AAA-Domäne (AAA) auf. Die verwendeten Bcs1-Varianten trugen N-terminale Verkürzungen. Die Deletionen umfassten den N-Terminus bis zur Aminosäure 40 (Δ40), oder bis zum Ende der TM (Δ65).

Aus früheren Arbeiten war bekannt, dass die Deletion der ersten 40 Aminosäurereste (Δ40) nicht zur Inaktivierung von BCS1 führt, die Deletion der Transmembrandomäne (Δ65) dagegen schon (Fölsch et al., 1996). Nun sollte untersucht werden, wie sich die angesprochenen Bcs1-Varianten hinsichtlich ihrer Interaktion mit Rip1 unterscheiden. Δ40Bcs1 bildet wie endogenes Bcs1 und episomal exprimiertes Voll-längen-Bcs1 oligomere Komplexe und bindet zugegebenes Rip1, was zu der bekannten Änderung des Laufverhaltens in der Nativgelelektrophorese führt (Abb. 3.23). Ebenso wurde für Δ65Bcs1 eine Oligomerisierung beobachtet. Im Gegensatz zu Δ40Bcs1 konnte aber keine Bindung von Rip1 an Δ65Bcs1 nachgewiesen werden. Die Transmembrandomäne scheint also für die

Interaktion mit Rip1, die der Konformationsänderung und dem somit veränderten Laufverhalten zugrunde liegt, unabdingbar.

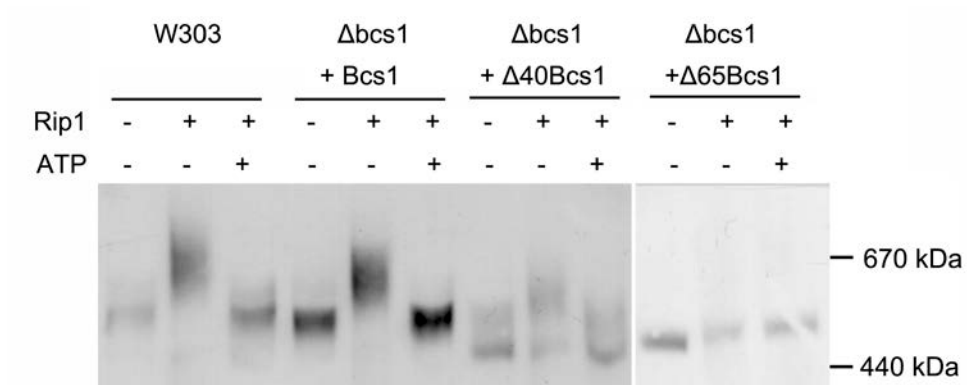


Abb. 3.23: Wechselwirkung von BCS1-Varianten mit Rip1

Die elektrophoretische Mobilität von BCS1-Varianten (s. Abb. 3.22) wurde mittels Nativgelelektrophorese mit Mitochondrienlysaten wie in Abb. 3.3 untersucht. Als Bindungspartner wurde rekombinantes Rip1 in Gegenwart oder Abwesenheit von ATP (2 mM) verwendet.

4. Diskussion

BCS1 wurde als neuartige Proteintranslokase postuliert (s. Kapitel 1.3.2), die Rip1 in der mitochondrialen Matrix bindet und über die Innenmembran transloziert (Wagener et al., 2011). Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde BCS1 im Rahmen dieser Arbeit funktionell charakterisiert. In Mitochondrienlysaten oder nach chromatographischer Anreicherung geht BCS1 eine Wechselwirkung mit Rip1 ein, die durch ATP-Hydrolyse gelöst werden kann. Diese Wechselwirkung ging mit einer drastischen Konformationsänderung des Bcs1-Komplexes (BCS1) einher. Im Weiteren wurde die Interaktion von BCS1 mit Rip1 mit isolierten Mitochondrien untersucht. Dies erbrachte zunächst Ergebnisse, die im Widerspruch zu den Befunden von Experimenten mit isoliertem oder solubilisiertem BCS1 zu stehen schienen. Aufgelöst wurde diese Diskrepanz, indem verschiedene Bereiche des Rip1-Proteins in Bezug auf ihre Wechselwirkung mit BCS1 untersucht wurden. Weiterführend wurden auch unterschiedliche Domänen in Bcs1 auf ihre Funktion hin untersucht. Wie diese Untersuchungen zeigten, sind verschiedene Domänen von Rip1 bzw. BCS1 für unterschiedliche Schritte der durch Bcs1 vermittelten Topogenese notwendig sind. Diese Ergebnisse beschreiben zum ersten Mal, welche molekularen Ereignisse die Biogenese von Rip1 von der Matrix bis zu dessen Assemblierung in den Komplex III der Atmungskette bestimmen.

4.1 Bcs1 ist eine Translokase für Rip1

Die Rolle von BCS1 als Proteintranslokase für Rip1 wurde gleichzeitig mit dieser Arbeit entdeckt (Wagener et al., 2011). Zwei Kriterien müssen erfüllt sein, um BCS1 eine Rolle als Proteintranslokase zuordnen zu können. Erstens muss eine direkte Interaktion zwischen BCS1 und Rip1 existieren, mithilfe derer die Translokation bewerkstelligt wird. Zweitens müssen Auswirkungen auf die submitochondriale Lokalisation von Rip1 feststellbar sein, wenn BCS1 als Translokase nicht zur Verfügung steht. Der erste Aspekt wurde in der vorliegenden Arbeit im Detail untersucht. Der zweite Aspekt wurde parallel zu dieser Arbeit untersucht (Wagener et al., 2011) und hier nur hinsichtlich der Frage verfolgt, unter welchen Bedingungen das translozierte Rip1 von Bcs1 gelöst wird.

Die Wechselwirkung zwischen BCS1 und Rip1 wurde auf mehrfache Weise untersucht. In Mitochondrienlysaten oder bei angereichertem BCS1 war diese Wechselwirkung stabil, in

intakten Mitochondrien jedoch transient und in intakten Zellen mit endogenem Protein nicht nachweisbar. Dennoch gelang es, die Interaktion und die darauffolgende Assemblierung in den Komplex III mit radiokativ markiertem Rip1 in isolierten Mitochondrien zu verfolgen. Die Bedingungen, unter denen die beobachteten Interaktionen ablaufen, erscheinen physiologisch sinnvoll. Zum einen ist die Interaktion nur von kurzer Dauer, weil die Translokation ein Schritt von vielen im Biogeneseweg von Rip1 darstellt. In Übereinstimmung mit der erwarteten Abfolge der molekularen Ereignisse, wurde die Assemblierung von Rip1 in den Komplex III der Atmungskette erst festgestellt, nachdem die Wechselwirkung mit BCS1 gelöst war. Zum anderen ist die Interaktion nicht transient in dem Sinne, dass sie sich in einem Gleichgewicht wieder lösen kann. Die Interaktion wird vielmehr in einer spezifischen Weise mittels ATP-Hydrolyse gelöst. Dies spricht dafür, dass Rip1 nach der Translokation gezielt dem nächsten Schritt der Biogenese zugeführt wird.

Wegweisende Erkenntnisse zur Funktion von BCS1 als Proteintranslokase wurden aus der Lokalisation von Rip1 in verschiedenen Mutanten abgeleitet (Wagener et al., 2011). Die Deletion von *BCS1* ($\Delta bcs1$) führt dazu, dass Rip1 in der Matrix akkumuliert. In Mitochondrien ohne Cytochrom *c*₁ ($\Delta cyt1$) ragt der C-Terminus von Rip1 wie beim reifen, im Komplex III assemblierten Protein in den Intermembranraum. Dieses Rip1 sitzt in oder fest assoziiert mit der Innenmembran der $\Delta cyt1$ -Mitochondrien. Ungeklärt war die Frage, ob Rip1 frei in der Membran oder in Assoziation mit BCS1 vorliegt. In isolierten Mitochondrien, in denen Cytochrom *c*₁ defizient ist ($\Delta cyt1$), wird Rip1 nach einer initialen Interaktion von BCS1 gelöst. Rip1 bleibt folglich nicht am BCS1-Komplex gebunden. Rip1 wird stattdessen über die Innenmembran transloziert und anschließend in diese Membran entlassen. BCS1 agiert demnach als Translokase unabhängig von Komplexvorstufen (p-III und p-III₂) (Wagener et al., 2011).

Eine Translokationsfunktion ist in der Familie der AAA-Proteine nichts Ungewöhnliches. Die Protease ClpA transloziert beispielsweise Substratproteine durch einen zentralen Kanal (Hoskins et al., 2001). Ähnliches gilt für die mitochondriale AAA-Protease Yta10/12 (Lee et al., 2011). Ungewöhnlich ist allerdings das BCS1-Substrat Rip1, da es sich bei Rip1 um ein gefaltetes Protein mit gebundenem Eisen-Schwefel-Cluster handelt. Bei den Substraten von ClpA, Yme1 und Yta10/12 handelt es sich um fehlgefaltete Proteine oder um Proteine, die während der Translokation durch das jeweilige AAA-Protein entfaltet werden.

4.2 Welche molekularen Eigenschaften von Bcs1 sind für die Translokase-Funktion nötig?

4.2.1 Die Oligomerisierung von Bcs1

Um die Frage zu klären, wie Bcs1 die Translokation von Rip1 bewerkstelligen kann, wurde zunächst der Oligomerisierungszustand des Proteins untersucht. Nach aktuellem Kenntnisstand liegen alle funktionellen AAA-Proteine als Oligomere vor. Viele AAA-Proteine translozieren entfaltete Substratproteine durch einen zentralen Kanal, der von einer oligomeren Ringstruktur umschlossen wird (Hoskins et al., 2001, Jarosch et al., 2002, Sauer et al., 2004, White and Luring, 2007, Mogk et al., 2008).

Die angesprochenen Strukturen können Homo- oder Heterooligomere darstellen. Analysen des chromatographisch angereicherten BCS1-Komplexes mittels Nativgelelektrophorese und Massenspektrometrie zeigten, dass es sich bei Bcs1 um ein Homooligomer handelt.

Als nächstes sollte die Frage geklärt werden, welcher Oligomerisierungsgrad im homooligomeren BCS1-Komplex vorliegt. Aus der Nativgelelektrophorese ergab sich eine apparente molekulare Masse des BCS1-Komplexes von 500-550 kDa. Weitere Experimente zeigten jedoch, dass diese Massenabschätzung unzureichend war. Nach chemischer Vernetzung des angereicherten BCS1-Komplexes durch Behandlung mit Glutaraldehyd wurde nämlich eine Masse von 320 kDa ermittelt, was der Masse eines theoretischen Hexamers ($6 \times 53 \text{ kDa} = 318 \text{ kDa}$) sehr nahe kommt. Da es sich bei Bcs1 um ein Transmembranprotein mit hydrophoben Bereichen handelt, ist die Massenabschätzung mittels Nativgel möglicherweise weniger zuverlässig. Inzwischen wurde die hexamere Struktur in einer Kooperation mit P. Wendler mittels „*Negative staining*“ und Elektronenmikroskopie bestätigt. Dies deckt sich mit Erkenntnissen zu anderen AAA-Proteinen, die in großer Mehrzahl als Hexamere vorliegen.

In anderen Studien wurden verschiedene Bcs1-immunreaktive Komplexe beobachtet, die apparente Massen zwischen 300 kDa und 600 kDa aufwiesen (Nouet et al., 2009, Zara et al., 2009). Zara et al. wiesen mittels 2D-Gelelektrophorese eine Interaktion des Präkomplexes (p-III), der alle Komponenten bis auf Rip1 und Qcr10 enthielt, mit Bcs1 nach. Bei Nouet et al. wurde neben einem 300 kDa-Komplex ein weiterer Bcs1-immunreaktiver Komplex detektiert. In diesem Fall liegt eine Assoziation mit dem Präkomplex p-III ebenfalls nahe. Unter den Lysebedingungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, konnte eine Assoziation mit dem Präkomplex p-III ausgeschlossen werden.

Gibt es eine funktionelle Korrelation zwischen der Oligomerisierung von Bcs1 und der Translokation? Diese Frage lässt sich anhand der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bcs1-Varianten nicht eindeutig beantworten. Varianten, die nicht oligomerisierten, wiesen immer auch weitere Beeinträchtigungen auf. Ein zentraler Kanal, durch den das Substrat geschleust wird, scheint jedenfalls ein Charakteristikum vieler AAA-Proteine zu sein (Hoskins et al., 2001, Jarosch et al., 2002, Sauer et al., 2004, White and Lauring, 2007, Mogk et al., 2008). Dieser Kanal wird bei allen bekannten Strukturen von mehreren Proteinen gebildet. Zum anderen werden die Nukleotidbindetaschen von je zwei Untereinheiten gebildet, wie die gelösten Kristallstrukturen von AAA-Proteinen zeigen (Lenzen et al., 1998, Yu et al., 1998, Bochtler et al., 2000, Sousa et al., 2000, Zhang et al., 2000, Wang et al., 2001). Auch diese Beobachtung spricht für die Notwendigkeit einer Oligomerisierung. Das Prinzip oligomerer Translokasen scheint nicht nur bei AAA-Proteinen verwirklicht zu sein. Die korrekte Heterooligomerisierung des SecYEG-Translokons in *Escherichia coli* beispielsweise unterliegt sogar einer Qualitätskontrolle durch das Syd-Protein. Falsch assemblierte Heterooligomere werden dissoziiert und proteolytisch abgebaut (Matsuo et al., 1998, Dalal et al., 2009, Dalal and Duong, 2011). Auch das TAT-System kann nach gängiger Vorstellung erst als Translokase aktiv werden, wenn verschiedene Subkomplexe zum aktiven TAT-Komplex assemblieren (Robinson et al., 2011). Dem liegt vermutlich das Prinzip zugrunde, Teile des im Prozess der Translokation befindlichen Proteins von der Membran abzuschirmen.

4.2.2 Die Walker-Box B ist für die Freisetzung von Rip1 erforderlich

Die Wechselwirkung zwischen BCS1 und Rip1 wurde in verschiedenen experimentellen Ansätzen nachgewiesen. In isolierten Mitochondrien wurde die transiente Wechselwirkung nach dem Import von radiokativ markiertem Rip1 untersucht. Rekombinantes Rip1 konnte an BCS1 aus lysierten Mitochondrien gebunden werden. Diese Bindung konnte sowohl durch die spezifische Anreicherung von Rip1 mit His₆-markiertem BCS1, als auch durch das veränderte Laufverhalten von BCS1 in der Nativgelelektrophorese demonstriert werden. In allen Experimenten führte die Zugabe von ATP zur Freisetzung von Rip1 aus BCS1.

Um die Spezifität dieses Befunds zu bestätigen, wurde eine Punktmutation (E319Q) in die ATP-Hydrolyse-Stelle (Walker-Box B) von Bcs1 eingeführt. Die so generierte Bcs1-Variante bildete oligomere Komplexe und konnte Rip1 in Mitochondrienlysaten binden, aber nicht freisetzen. Erstaunlicherweise ging die Rip1-Bindung nicht mit der Änderung des Laufverhaltens einher, wie sie vom Wildtyp-BCS1 bekannt war. Offenbar führt die Mutation

zum Ausfall der Konformationsänderung des BCS1-Oligomers, die durch Rip1-Bindung induziert wird. Aus diesem Grund kann Rip1 vermutlich auch nicht freigesetzt werden.

Ähnlich wie in den hier diskutierten Ergebnissen zum Verhalten von Bcs1(E319Q), führte die Mutation E→Q bei verschiedenen anderen AAA-Proteinen zu einer Arretierung des Substrats (Babst et al., 1998, Weibezahn et al., 2003, Dalal et al., 2004), d.h. es konnte als Substratfalle eingesetzt werden. Interessanterweise wurde in intakten Zellen und in isolierten Mitochondrien keine Wechselwirkung von Rip1 mit BCS1(E319Q) festgestellt. Mittels chromatographischer Anreicherung des His₆-markierten BCS1(E319Q) konnte weder endogenes Rip1 noch radioaktiv markiertes, in isolierte Mitochondrien importiertes Rip1 mitangereichert werden (Daten nicht gezeigt). Allerdings war die endogene Konzentration der Bcs1-Variante im Vergleich zum Wildtyp-Bcs1 stark reduziert. Möglicherweise wird der Komplex proteolytisch abgebaut, sobald Rip1 gebunden und nicht weiter transloziert bzw. freigesetzt werden kann. Es erscheint unwahrscheinlich, dass Rip1 gar nicht erst gebunden werden kann. Zum einen findet in den Experimenten mit lysierten, BCS1(E319Q)-enthaltenden Mitochondrien eine Bindung von Rip1 statt. Zum anderen ist von anderen AAA-Proteinen bekannt, dass die initiale Substratbindung keine ATP-Hydrolyse erfordert (Ogura and Wilkinson, 2001). Für die Möglichkeit eines proteolytischen Abbaus sprechen auch die Befunde zu den Rip1-Varianten Rip1₆₁₋₂₁₅ und Rip1₉₁₋₂₁₅. Diese waren in intakten Zellen nicht detektierbar. In isolierten Mitochondrien konnte jedoch eine Bindung der radioaktiv markierten Proteine an BCS1 nachgewiesen werden.

Die Hydrolyse von ATP ist für die Freisetzung von Rip1 aus dem BCS1-Komplex nötig. Deshalb stellt sich die Frage, ob dies mit den enzymatischen Mechanismen anderer AAA-Proteine vergleichbar ist. AAA-Proteine sollen eine mechanische Kraft auf ihre Substrate ausüben (Ogura and Wilkinson, 2001, Hinnerwisch et al., 2005). Eine vergleichbare Zugkraft könnte bei der Translokation von Rip1 wirksam sein. Nach gängiger Vorstellung wird diese Zugkraft über sogenannte Porenschleifen ausgeübt, die ihre Konformation nach ATP-Hydrolyse ändern (Hinnerwisch et al., 2005). Diese Porenschleifen sind bei anderen AAA-Proteinen essentiell für die Substratinteraktion und weisen charakteristische Motive (z.B. GYVG bei ClpA) auf (Siddiqui et al., 2004, Hinnerwisch et al., 2005). Verblüffenderweise besitzt Bcs1 kein Motiv, das denen bekannter Porenschleifen ähnlich ist. Allerdings gibt es Befunde zu einer Bcs1-Mutation (F342C) mit defizienter Translokase-Funktion, so dass Rip1 nicht im Komplex III assembliert wird. Die Autoren der Studie postulierten, die mutierte Stelle liege im BCS1-Komplex in räumlicher Nähe zur Porenregion, durch die Rip1 transloziert wird (Nouet et al., 2009). Bisher gibt es allerdings keine Erkenntnisse, wie F342 eine Substratinteraktion vermitteln könnte.

Wie wird die Energie aus der Nukleotidhydrolyse bei anderen Proteintranslokasen genutzt? Anders als bei AAA-Proteinen und ABC-Transportern wird die Hydrolyse von ATP oder GTP bei vielen Translokase-Systemen nicht durch den Translokase-Komplex selbst, sondern durch Hilfs- oder Partnerproteine nutzbar gemacht. Das Sec-Translokon beispielsweise ist für sich gesehen ein „passiver Kanal“ (Mori et al., 2010), der erst durch die Assoziation mit Ribosomen oder der SecA-ATPase aktiv wird. Auch die Translokase der inneren Mitochondrienmembran (Tim23) benötigt Hsp70 (und J-Proteine), um eine Zugkraft auf die zu importierenden Substratproteine auszuüben (Mokranjac et al., 2005). Das TAT-System dagegen nutzt den pH-Gradienten anstelle einer Nukleotidhydrolyse, um die für die Translokation nötige Energie zu gewinnen. Der Mechanismus ist allerdings kaum verstanden (Robinson et al., 2011). Daneben gibt es Translokase-Systeme, die ohne direkte Energiequelle vermittels steigender Affinitäten arbeiten. Dies gilt beispielsweise für die Translokase der äußeren Mitochondrienmembran, den TOM-Komplex.

4.2.3 Die Transmembrandomäne von Bcs1 vermittelt eine Konformationsänderung

Bcs1 durchspannt mit einer Domäne von 14 Aminosäureresten die Innenmembran. Eine N-terminale Deletion einschließlich dieser Domäne ($\Delta 65$) beeinträchtigte die Oligomerisierung nicht, allerdings war bei Experimenten mit lysierten Mitochondrien keine Konformationsänderung durch Zugabe von Rip1 feststellbar. Anders verhielt es sich, wenn die ersten 40 Reste ($\Delta 40$) deletiert wurden, die in den Intermembranraum ragen. Diese verkürzte Variante ($\Delta 40$ Bcs1) bildet einen Komplex, dessen Laufverhalten in der Nativgelelektrophorese durch Bindung von Rip1 verändert ist. Wie sich aus diesen Ergebnissen ableiten lässt, ist die Transmembrandomäne von Bcs1 für die Induktion der Konformationsänderung nötig. Ebenso ist beim Substrat Rip1 die Transmembrandomäne (Aminosäurereste 50-80) erforderlich, um das veränderte Laufverhalten von BCS1 zu induzieren. Rip1-Varianten, bei denen die Transmembrandomäne ganz oder um zehn Reste verkürzt ist (Rip1₆₁₋₂₁₅ und Rip1₉₁₋₂₁₅) führen keine Konformationsänderung von gereinigtem oder solubilisertem BCS1 herbei. In isolierten Mitochondrien werden diese Varianten gebunden, können aber nur teilweise (Rip1₆₁₋₂₁₅) oder gar nicht (Rip1₉₁₋₂₁₅) freigesetzt werden.

Wie können diese Ergebnisse interpretiert werden? Ein Transmembransegment kann bei der Sortierung eines Proteins als „Membraninsertionssignal“ dienen. Wie die Befunde zu den

Rip1-Varianten Rip1₆₁₋₂₁₅ und Rip1₉₁₋₂₁₅ bekräftigen, dient die Transmembrandomäne von Rip1 im Translokationsprozess als Signal für die Freisetzung in die Membran. Berücksichtigt man zusätzlich die Experimente mit den Varianten $\Delta 40$ Bcs1 und $\Delta 65$ Bcs1, scheint die Membraninsertion von Rip1 durch die Transmembrandomänen im BCS1-Komplex vermittelt zu werden. Insbesondere spielt offenbar die Konformationsänderung dabei eine wesentliche Rolle.

Helikasen aus der Familie der AAA-Proteine öffnen lateral die Ringstruktur des Komplexes und nehmen so DNA auf bzw. setzen diese frei (Ahnert et al., 2000). BCS1 könnte sein Substrat Rip1 in ähnlicher Weise lateral freisetzen, was auch physiologisch sinnvoll wäre. Die Frage ist, ob es bei AAA-Proteinen vergleichbare Mechanismen gibt, die an Protein- statt DNA-Substraten wirksam sind. In der Tat können die mitochondrialen AAA-Proteasen Yme1 und Yta10/12 Transmembransegmente von Proteinen aus der Innenmembran aufnehmen. Die Extraktion der Membranproteine aus der Lipidphase ist ATP-abhängig. Die extrahierten Proteine werden durch eine Chaperon-Domäne transloziert und einer Protease-Domäne zugeführt (Tatsuta and Langer, 2009). Der von BCS1 vermittelte Translokationsvorgang soll in Bezug auf die mitochondrialen AAA-Proteasen in umgekehrter Richtung ablaufen (Wagener et al., 2011). Demnach scheint die Abfolge der Translokationsereignisse wie folgt: Zunächst wird Rip1 aus der Matrix aufgenommen und durch die Ringstruktur des BCS1-Komplexes geschleust. Gegen Ende dieses Prozesses führt die Erkennung der Rip1-Transmembrandomäne durch die Transmembrandomäne von BCS1 zu einer weitgehenden Konformationsänderung in BCS1. Dadurch wird der BCS1-Komplex möglicherweise so umgeordnet, dass Rip1 ATP-abhängig in die Membran freigesetzt werden kann. Der Komplex ist dann bereit, eine neue Translokationsrunde zu initiieren.

4.3 Wie wird Rip1 über die innere Membran der Mitochondrien transloziert?

Rip1 erreicht seinen endgültigen Faltungszustand in der mitochondrialen Matrix und muss von dort über die Innenmembran transloziert werden (Wagener et al., 2011). Wie kann ein gefaltetes Protein wie Rip1 über eine Membran transloziert werden? In Prokaryoten (Robinson et al., 2011) und Chloroplasten (Molik et al., 2001, Robinson and Bolhuis, 2004) wird das Rieske-Protein vom TAT-System transportiert. Das TAT-System kann gefaltete Proteine translozieren (Mould and Robinson, 1991, Cline et al., 1992, Berks, 1996, Weiner et al., 1998, Robinson and Bolhuis, 2004, Gohlke et al., 2005, Muller and Klosgen, 2005, Palmer et al., 2005). Dabei scheint es sich an die Größe seiner Substratmoleküle anpassen zu können. Wie elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, bilden TatA-Protomere kanalähnliche Komplexe mit variablem Durchmesser aus (Robinson et al., 2011). Die Größenordnung der visualisierten Pore steht im Einklang mit den Durchmessern charakterisierter TAT-Substrate aus *Escherichia coli* (Robinson et al., 2011). Die C-terminale Domäne von Rip1 umfasst ungefähr 120 Aminosäuren. Dies entspricht einem Durchmesser von 2,5-3 nm. Während Domänen dieser Größe kein Problem für das TAT-System darstellen, findet man in Oligomeren aus AAA-Proteinen häufig nur relativ kleine Porenöffnungen. Berechnungen zufolge kann die Pore von ClpA maximal 0,9 nm im Durchmesser sein (Guo et al., 2002), was für die Rip1-Domäne zu klein wäre. ClpA transloziert entfaltete Proteine, die zum Abbau bestimmt sind. Nach neueren Untersuchungen können AAA-Proteine aber nicht nur entfaltete Proteine, sondern auch Polypeptidschleifen aufnehmen (Burton et al., 2001, Hoskins et al., 2002, Glynn et al., 2009). Darüberhinaus kann der zentrale Kanal von Hsp104 (genauer des NBD-Rings), einem Chaperon, abhängig vom gebundenen Nukleotid einen Durchmesser von bis zu 7,8 nm annehmen (Wendler et al., 2009).

Andererseits gibt es für einige AAA-Proteine Modelle, bei denen das Substrat nicht durch einen zentralen Kanal transloziert wird. Das AAA-Protein p97/VCP extrahiert Membranproteine aus der Membran des endoplasmatischen Reticulums, so dass diese durch das Proteasom abgebaut werden können (Ye et al., 2001, Rabinovich et al., 2002). Aufgrund des geringen Kanaldurchmessers (0,55 nm) wurde argumentiert, die p97/VCP-Substrate könnten an der Oberfläche des Hexamers transloziert werden. Tatsächlich beeinflussen die Konformationsänderungen im Zuge von ATP-Bindung und -Hydrolyse vor allem die Oberfläche des Hexamers (DeLaBarre and Brunger, 2005). Dies unterstützt ein Modell, demzufolge Substratproteine für die Translokation nur teilweise entfaltet werden müssten. Insbesondere wäre damit erklärbar, wie sperrige Oligoglykosylgruppen an

Substratproteinen transloziert werden. Andererseits ist die Pore groß genug, um entfaltete Polypeptidketten zu transportieren, sofern diese keine sperrigen Oligoglykosylgruppen tragen.

Um aufzuklären, wie BCS1 das gefaltete Rip1 transloziert, wurden verschiedene Rip1- und Bcs1-Varianten untersucht. Dabei sollten Bereiche identifiziert werden, die eine Interaktion beider Proteine vermitteln. N-terminal verkürzte Rip1-Varianten (Rip1₆₁₋₂₁₅ und Rip1₉₁₋₂₁₅) induzierten keine Konformationsänderung in isoliertem oder solubilisiertem BCS1. Auf der anderen Seite konnten Rip1₆₁₋₂₁₅ und Rip1₉₁₋₂₁₅ nach dem Import in isolierte Mitochondrien an BCS1 binden. Während Mutanten, deren C-terminale Domäne deletiert (Rip1₁₋₁₂₃) oder entfaltet (Rip1-*A-stretch*) ist, nach dem Import keine Interaktion mit BCS1 aufwiesen, konnten sie die Konformationsänderung in gereinigtem oder solubilisiertem BCS1 induzieren. Dies erscheint zunächst widersprüchlich. Durch ein weiteres Experiment konnte dieser Widerspruch aufgelöst werden. Da die Konformationsänderung das N-terminale Segment von Rip1 erfordert, wurde für dieses Experiment Rip1 untersucht, das dieses Segment enthält, darüberhinaus aber auch eine gefaltete C-terminale Domäne aufweist. Dieses gefaltete Rip1 löst keine Konformationsänderung aus, obwohl seine Bindung an BCS1 nachgewiesen werden konnte. Die nachgewiesene Bindung des gefalteten Rip1 an BCS1 scheint demnach durch eine Wechselwirkung mit der C-terminalen Domäne zustande zu kommen.

Ungefaltetes Rip1 kann dagegen nicht über seine C-terminale Domäne an BCS1 binden. Allerdings kann das N-terminale Segment des ungefalteten Rip1 noch mit dem Transmembranbereich von solubiliertem BCS1 interagieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Konformationsänderung in BCS1 innerhalb des Transmembransegments erfolgen oder durch dieses vermittelt werden muss, da Mutanten, bei denen die Transmembrandomäne deletiert ist, nur eine Konformation aufwiesen. Experimente, bei denen die Konformation von BCS1 und die Bindung von Rip1 in An- und Abwesenheit von ATP untersucht wurden, zeigten ein ATP-Hydrolyse-abhängiges Lösen des Substrates vom BCS1-Komplex.

Bezüglich der Identifikation einer Erkennungssequenz für BCS1 in der C-terminalen Domäne von Rip1, sollte noch erwähnt werden, dass die Interaktion mit den Aminosäureresten 172-179 zwar in der Peptidbibliothek nachgewiesen werden konnte, die *A-stretch*-Mutante, in der diese Sequenz ersetzt wurde, aber nicht gefaltet vorlag, so dass nicht unterschieden werden konnte, ob der Effekt nicht nur auf der fehlenden Faltung beruht.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wird folgendes Modell des Biogenese-Weges von Rip1 vorgeschlagen: Rip1 wird als Vorläufer-Protein vollständig in die mitochondriale Matrix importiert. Dort finden zwei proteolytische Prozessierungsschritte statt, bei denen 30

Aminosäuren vom N-Terminus entfernt werden. Außerdem erfolgt die Anknüpfung des Eisen-Schwefel-Clusters an Aminosäurereste der C-terminalen Domäne, die infolgedessen ihren endgültigen Faltungszustand erreicht. Diese gefaltete, das Eisen-Schwefel-Cluster-enthaltende Domäne initiiert die Wechselwirkung mit der Matrixdomäne des BCS1-Komplexes in der mitochondrialen Innenmembran. Daraufhin wird Rip1 vermutlich durch einen zentralen Kanal durch das BCS1-Hexamer transloziert. Dieser Translokationsvorgang schreitet fort, bis das N-terminale Segment von Rip1 mit dem Transmembranbereich von BCS1 interagieren kann. Diese Interaktion löst eine Konformationsänderung in BCS1 aus und es kommt zur ATP-abhängigen Freisetzung von Rip1 in die Membran. Diese Freisetzung erfolgt unabhängig von Vorstufen von Komplex III.

4.4 Gibt es eine Qualitätskontrolle bei der Rip1-Translokation?

BCS1 erkennt die gefaltete C-terminale Domäne von Rip1 und transloziert das reife Protein offensichtlich ohne weitere Entfaltung. Damit wäre BCS1 nicht nur hinsichtlich der Translokationsfunktion, sondern auch hinsichtlich der Eigenschaft, gefaltete Substrate zu transportieren, mit dem TAT-System vergleichbar. Viele TAT-Substrate, darunter Proteine mit Eisen-Schwefel-Clustern (Musser and Theg, 2000), werden nur in gefalteter Form transportiert (Robinson et al., 2011). Insbesondere wurde nachgewiesen, dass nicht oder falsch gefaltete Eisen-Schwefel-Proteine vom TAT-System nicht transloziert werden (Matos et al., 2008). Könnte also BCS1 eine ähnliche Qualitätskontrolle bewerkstelligen, in dem es nur gefaltetes Rip1-Protein transloziert?

Rip1 wird vollständig in die mitochondriale Matrix importiert, bevor es über die Innenmembran transloziert und in den Komplex III eingebaut wird (Hartl et al., 1986, Golik et al., 2003, Wagener et al., 2011). Eine eventuelle Qualitätskontrolle müsste sicherstellen, dass die Reifungsprozesse, die Rip1 in der Matrix durchläuft, erfolgreich abgeschlossen wurden. Während die erste Proteolyse durch die MPP für die Assemblierung von Rip1 in den Komplex III unabdingbar ist, kann Rip1 auch assembliert werden, wenn die MIP-Prozessierung nicht erfolgt (Nett and Trumpower, 1999). Als dritter und vermutlich letzter Schritt erfolgt der Einbau des Eisen-Schwefel-Clusters in die C-terminale Domäne. Die Cluster-Bindung erfordert eine korrekte Faltung von Rip1. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eindeutig, dass die Faltung der C-terminalen Domäne von Rip1 Voraussetzung für die Interaktion mit BCS1 und die folgende Assemblierung in den Komplex III ist.

Rip1 wird von BCS1 über die innere Mitochondrienmembran transloziert und anschließend an Vorstufen von Komplex III abgegeben. Durch den Translokationsvorgang wird die C-terminale Domäne zum Intermembranraum exponiert (Wagener et al., 2011). Würde entfaltetes Rip1 transloziert, müsste diese Domäne im Intermembranraum falten und dort das Cluster binden.

Die Assemblierung von Eisen-Schwefel-Clustern findet in der Matrix statt (Lill and Mühlenhoff, 2006). Dennoch könnte das Cluster theoretisch auch im Intermembranraum gebunden werden, da die Innenmembran einen Transporter für Eisen-Schwefel-Cluster (Atm1) enthält (Kispal et al., 1999). Die Deletion dieses Transporters ($\Delta atm1$) beeinträchtigt die Bindung des Rieske-Clusters jedoch nicht (Lill, persönliche Kommunikation). Es gibt zwei Erklärungen, warum das Cluster trotz eines Exportwegs für Eisen-Schwefel-Cluster (Atm1) in der Matrix gebunden wird. Erstens sind spezifische Chaperone für die Bindung des Clusters nötig (Ssq1). Während zahlreiche Chaperone der Matrix (u.a. Ssc1, Hep1, Ssq1) bekannt sind, ist weit weniger bekannt über die Faltung von Proteinen im Intermembranraum. Vielleicht wäre es in der Evolution der Mitochondrien aufwändiger gewesen, die benötigten Chaperone in einem weiteren Subkompartiment der Mitochondrien zu platzieren. Schließlich ist das Rieske-Cluster das einzige Cluster im Intermembranraum. Zweitens könnten die physikalisch-chemischen Bedingungen in der Matrix für die Bindung des Clusters günstiger sein als die im Intermembranraum. Zum einen herrscht im Intermembranraum ein hohes Redoxpotential (Hu et al., 2008), das u.a. für die oxidative Proteinfaltung und den Proteinimport genutzt wird (Herrmann and Riemer, 2012). Zum anderen liegt eine hohe Konzentration an metallhaltigen Cofaktoren vor, die eine kontrollierte Bindung von Eisen für das Cluster beeinträchtigen könnten.

Wie sehen Qualitätskontrollen bei anderen Proteintranslokasen aus? Die Mehrzahl der bekannten Translokasen transportiert entfaltete Polypeptidketten. Damit wird das Problem umgangen, die Porengröße für den Translokationsvorgang an den Durchmesser des Substrats anzupassen, wie es beim TAT-System erforderlich ist (s. Kapitel 4.4). Das TAT-System selbst kann fehlgefaltete Substrate zurückweisen. Einer Hypothese zufolge müssen in *E. coli* TAT-Substrate hydrophobe Bereiche abschirmen, um transloziert zu werden. Mutagenese-Studien zeigten, dass Polypeptide mit exponierten hydrophoben Bereichen vom TAT-System nicht transloziert werden (Panahandeh et al., 2008, Robinson et al., 2011). Wie fehlgefaltete Eisen-Schwefel-Proteine zurückgewiesen werden (Musser and Theg, 2000), ist mechanistisch noch nicht verstanden. Insbesondere ist nicht bekannt, ob dabei die Anknüpfung des Clusters überprüft wird. Bei Chloroplasten ist die Qualitätskontrolle bisher weniger untersucht worden, weil weniger Substrate einen Cofaktor tragen. Die Zurückweisung von Substraten ist auch hier ein bisher wenig untersuchtes Phänomen. So

werden in pflanzlichen Protoplasten ca. 50% der endogenen Substrate zurückgewiesen und akkumulieren im Stroma. Dies wird vermieden, wenn die Prozessierung durch die Thylakoid-Prozessierungspeptidase blockiert wird (C. Robinson, persönliche Kommunikation). Möglicherweise wird der Translokationsvorgang durch die Assoziation des Substrats mit der Peptidase derart verzögert, dass dies eine Qualitätskontrolle ermöglicht. In ähnlicher Weise scheint auch beim bakteriellen TAT-System und beim Sec-Translokon die proteolytische Prozessierung eine Kontrollstelle zu sein. Unprozessierte Substrate bleiben in den jeweiligen Translokasen stecken.

4.5 Warum hat BCS1 das TAT-System in Mitochondrien ersetzt?

4.5.1 Evolutionäre Gesichtspunkte

Rip1 wird in die mitochondriale Matrix importiert und von dort zurück über die Innenmembran transloziert. Diesen Sortierungsweg durchlaufen einige Proteine der mitochondrialen Innenmembran. Für den Rücktransport aus der Matrix werden Membraninsertionssysteme genutzt, die oft eine Entsprechung in Bakterien finden und deshalb als evolutionsgeschichtlich „alt“ angesehen werden. Aus diesem Grund wird dieses Prinzip der Proteinsortierung mit dem Begriff „konservative Sortierung“ beschrieben. Ein Beispiel ist Oxa1, das mit dem bakteriellen YidC verwandt ist (Funes et al., 2011). Oxa1 vermittelt die Membraninsertion von mitochondrial kodierten und einigen nukleär kodierten Proteinen (Wang and Dalbey, 2011). Auch die Biogenese von Rip1 folgt dem Prinzip der konservativen Sortierung. In den α -proteobakteriellen Vorläufern der Mitochondrien erfolgte die Translokation des Rieske-Proteins über das TAT-System. Deshalb stellt sich die Frage, warum dieses System zugunsten von Bcs1 aufgegeben wurde.

In der Tat gibt es einen eukaryotischen Organismus, den Protisten *Reclinomonas americana*, in dem TAT-Gene – wenn auch nicht alle – auf der mitochondrialen DNA vorhanden sind (Gray et al., 2004). Gleichzeitig ist bei *Reclinomonas* aber auch Bcs1 vorhanden. Möglicherweise hat sich Bcs1 in der Evolution höherer Eukaryoten durchgesetzt, weil es für sein Substrat Rip1 am effizientesten ist. Das TAT-System dagegen kann theoretisch eine Vielzahl von Substraten translozieren, von denen in Mitochondrien mit Rip1 aber nur eines vorhanden ist. Da Rip1 das einzige Protein mit Eisen-Schwefel-Cluster im Intermembranraum ist, war die im Vergleich zum TAT-System kleinere und spezifischere Translokase BCS1 vermutlich ein Vorteil.

Ein wesentlicher Gesichtspunkt, warum sich das Rip1-spezifische BCS1 gegenüber dem TAT-System durchgesetzt hat, könnte in der Energiebilanz liegen. Es ist bekannt, dass beim TAT-System die Energie für die Translokation aus dem pH-Gradienten über der jeweiligen Membran bezogen wird (Robinson et al., 2011). Tatsächlich dissipiert die TAT-Maschinerie einen beträchtlichen Anteil der im pH-Gradienten gespeicherten Energie. Schätzungen gehen von 30.000 Protonen pro Substratmolekül aus. Da BCS1 die Energie aus der Hydrolyse von ATP bezieht, würde die Energiebilanz deutlich positiver ausfallen. An dieser Stelle muss man jedoch erwähnen, dass nicht abschließend geklärt ist, ob die Aktivität von Bcs1 völlig unabhängig vom Membranpotential ist.

Schließlich könnte BCS1 dem TAT-System überlegen sein, weil seine Funktionen über die Translokation von Rip1 hinausgehen. Bcs1 könnte die Assemblierung von Rip1 in einer Art und Weise regulieren, wie es das TAT-System nicht kann. In der Tat wurde die Hypothese formuliert, dass BCS1 als Kontrollstelle für die Assemblierung von Komplex III dienen könnte. Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies an Komplex III könnte zu einer negativen Rückkopplung führen, so dass die Reifung von Komplex III gedrosselt wird (Mineri et al., 2009). In der Tat scheint das Rieske-Protein an der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt zu sein (Armstrong et al., 2004). Allerdings werden reaktive Sauerstoffspezies auch an den Komplexen I und IV erzeugt, weshalb die zelluläre Antwort auf oxidativen Stress sich nicht auf den Komplex III beschränken kann. Beispielsweise wurde gezeigt, dass ein defizienter Komplex III zur Erhöhung der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies an Komplex I führt (Hinson et al., 2007).

4.5.2 Befunde zu alternativen BCS1-Funktionen

Es gibt Hinweise darauf, dass BCS1 an Prozessen beteiligt ist, die nicht im Zusammenhang mit der Assemblierung von Komplex III stehen. Diese Hinweise stammen aus Studien an Hefe und Säugern.

Für eine Studie von Nouet et al. (Nouet et al., 2009) wurden in Hefe chromosomale *BCS1*-Mutationen erzeugt. In der Folge wurden zusätzliche Mutationen nach einem Zufallsmechanismus eingeführt. Weiter analysiert wurden diejenigen Mutationen, die wieder einen atemungskompetenten Phänotyp herbeiführen konnten, der zunächst durch die *BCS1*-Mutationen verloren gegangen war. Da die neuen Mutationen nicht in Genen von Komplex-

III-Untereinheiten lokalisiert werden konnten, schlossen die Autoren, dass BCS1 bisher unbekannte Substrate oder Partner haben müsse. Interessanterweise wurde beim humanen Homolog BCS1L eine Wechselwirkung mit LETM1 nachgewiesen (Tamai et al., 2008). Bei LETM1 handelt es sich um das Homolog von Mdm38 aus Hefe, das als Komponente der mitochondrialen Export-Maschinerie bekannt ist (Frazier et al., 2006). Auch Mdm38 trug in der Nouet-Studie keine Mutationen und es bleibt zu klären, ob es neben Rip1 ein weiteres BCS1-Substrat sein könnte. Die auf massenspektrometrische Analysen gestützte Identifizierung einer Phosphorylierungsstelle (Serin 227) auf Bcs1 deutet allerdings darauf hin, dass die Aktivität von BCS1 durch eine Kinase reguliert werden könnte (Chi et al., 2007).

Immunhistochemische Untersuchungen an der Maus zeigten, dass das Bcs1-Homolog BCS1L während der embryonalen Entwicklung des Nervensystems, besonders in Zellfortsätzen, stark exprimiert wird. Das Rieske-Protein (in Säugern RISP genannt) dagegen wird in dieser Entwicklungsphase nicht exprimiert (Kotarsky et al., 2007). Zellatmung findet in dieser Phase nicht statt, weil Glukose primär über den Pentose-Phosphatweg verstoffwechselt wird (Todorich et al., 2009). Dies steht im Zusammenhang mit reduktiven Biosynthesen für die Myelinisierung, die in der genannten Entwicklungsphase ihren Höhepunkt erreicht (Connor and Menzies, 1996). Eisen stellt für die Myelinisierung einen trophischen Faktor dar. Beispielsweise benötigen die reduktiven Biosynthesen von Cholesterol und Lipiden für die Myelinscheide (25-30% Cerebroside) Eisen als Cofaktor von Schlüsselenzymen (Todorich et al., 2009). Vor diesem Hintergrund ist es interessant, dass einige BCS1L-Mutationen beim Menschen das GRACILE-Syndrom hervorrufen, das sich durch eine schwerwiegende Störung des Eisenhaushalts auszeichnet (Visapää et al., 2002). Überraschenderweise beeinträchtigten die BCS1L-Mutationen, die in Patienten mit dem GRACILE-Syndrom entdeckt wurden, die Aktivität von Komplex III nicht sonderlich. Visapää et al. postulierten, BCS1L könne eine allgemeine, nicht auf RISP beschränkte Rolle bei Synthese und Transport von Eisen-Schwefel-Proteinen haben. Dies wiederum könnte Auswirkungen auf den Eisenhaushalt haben, weil Eisen-Schwefel-Proteine bei der Synthese Eisen verbrauchen und beim Abbau Eisen freisetzen. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass Mitochondrien ohne mitochondriale DNA (ρ^0) den BCS1L-Komplex aufrechterhalten (Fernandez-Vizarra et al., 2007, Minerì et al., 2009). Dieser muss demnach eine Rolle spielen, die nicht mit Komplex III assoziiert ist.

Ungeklärt ist, wie die gewebspezifischen Ausprägungen von *BCS1L*-Mutationen beim Menschen zu erklären sind. Die identifizierten Mutationen verursachen verschiedene Krankheitsphänotypen (Ramos-Arroyo et al., 2009), die von vorwiegend neurologischen Syndromen wie der mitochondrialen Encephalopathie (Fernandez-Vizarra et al., 2007) oder

dem Bjørnstad-Syndrom (Hinson et al., 2007) bis zu Leber- und Nierenkrankheiten wie dem GRACILE-Syndrom (Visapää et al., 2002) reichen. Andererseits können *BCS1L*-Mutationen auch pleiotrope Effekte ausüben und zu multisystemischen Erkrankungen führen (de Lonlay et al., 2001). Deshalb wurde vorgeschlagen, dass die „phänotypische Variabilität von *BCS1L*-Mutationen von der Natur der Mutation und der gewebsspezifischen Expression des Gens abhängt“ (Ramos-Arroyo et al., 2009, übersetzt). Gewebsspezifische Unterschiede könnten auch dadurch zustande kommen, dass Bcs1-regulierende Faktoren unterschiedlich exprimiert werden. Wie schon erwähnt, wurde in Hefe eine Phosphorylierungsstelle (Serin 227) von Bcs1 identifiziert (Chi et al., 2007). Die gewebsspezifische Expression der beteiligten Kinase(n) könnte erklären, warum *BCS1L*-Mutationen in unterschiedlichen Geweben unterschiedliche Effekte hervorrufen. Beispielsweise führten die in Patienten mit mitochondrialer Encephalopathie entdeckten *BCS1L*-Mutationen je nach Zelltyp zu unterschiedlichen Auswirkungen auf die Assemblierung des Komplexes III (Fernandez-Vizarra et al., 2007). Darüberhinaus wurde vorgeschlagen, dass die unterschiedliche Empfindlichkeit von Geweben gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies eine Rolle bei der gewebsspezifischen Krankheitsausprägung spielt (Hinson et al., 2007). Allgemein wird festgestellt, dass mitochondriale Syndrome in der Regel eine gewebsspezifische Ausprägung haben (Visapää et al., 2002).

5. Abkürzungen

A	Alanin oder Adenin oder Ampère
α	anti
AAA	ATPases associated with diverse cellular activities
Abb.	Abbildung
ABC	ATP binding cassette
ADP	Adensoindiphosphat
AMP- PNP	Adenylylimidodiphosphat
Arg	Polyarginintag
Atm1	ABC Transporter, Mitochondrial
ATP	Adenosintriophosphat
Bcs1	Ubiquinol-cytochrome c reductase (bc1) Synthesis protein 1
BCS1	Hexamerer Komplex des Bcs1-Proteins
BCS1L	Bcs1-like protein 1
BNGE	Blaunativgelelektrophorese
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Celsius oder Cystein oder Cytidin
Cdc48	Cell Division Cycle Protein of 48kDa (funktionelles Ortholog von p97/VCP)
Ci	Curie
Cyt1	Cytochrome c ₁
D	Aspartat oder Durchflussfraktion
Δ	Deletion
$\Delta\psi$	Elektrochemischer Gradient
Da	Dalton (atomare Masseneinheit: $1,66 \cdot 10^{-27}$ kg)
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Glutamat oder Elutionsfraktion

EDTA	Ethylendiamintriessigsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin oder Guanin
g	Gramm oder Erdbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$)
GRACILE	growth retardation, aminoaciduria, cholestasis, iron overload, lactacidosis, and early death
GTP	Guanosintriphosphat
H	Histidin
h	Stunde
Hep1	Hsp70 escort protein 1
His	(Hexa-)Histidinyhtag = His-tag
HRP	Horseradish peroxidase
Hsp	Heat shock protein
I	Isoleucin
i	intermediär
Ig	Immunglobulin
Isu	Iron-sulfur cluster U homolog
K	Lysin
k	kilo ($= 10^3$)
L	Leucin
l	Liter
LB	lysogeny broth
LETM1	Leucine zipper-EF-hand-containing transmembrane protein 1
ln	Logarithmus naturalis
M	Molar (mol/l) oder Methionin
m	milli ($= 10^{-3}$) oder maturiert
μ	micro ($= 10^{-6}$)
Mdm38	Mitochondrial Distribution and Morphology protein of 38 kDa
min	Minute
MIP	Intermediäre Matrixpeptidase
mol	Stoffmengeneinheit (Avogadro-Konstante: $6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)
MPP	Matrixprozessierungspeptidase
MSS	Mitochondriale Signalsequenz
N	Asparagin
n	nano oder Versuchszahl
NBD	Nucleotide-binding domain

NiNTA	Nickelnitrilotriacetat
NSF	N-Ethylmaleinimid-sensitives Fusionsprotein (Sec18 in <i>S. cerevisiae</i>)
OD	Optische Dichte
Oxa1	cytochrome OXidase Activity
P	Prolin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	<i>potentia Hydrogenii</i> (Maß für die Wasserstoffionen-Aktivität)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
p97	
Pfu	Thermostabile DNA-Polymerase aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
PK	Proteinase K
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	Glutamin
R	Arginin
RCMLA	Reduziertes, carboxymethyliertes Lactalbumin
Rip1	Rieske Iron-sulfur Protein
RISP	Mammalian Rieske Iron-sulfur Protein
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
S	Serin
³⁵ S	Radioaktives Isotop von Schwefel
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec18	SECretry protein of 18kDa (funktionelles Ortholog von NSF)
SNARE	soluble <i>N</i> -ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
Ssc1	Stress-Seventy subfamily C
Ssq1	Stress-Seventy subfamily Q
Su9	Untereinheit 9 (der F ₁ F _o -ATPase)
T	Threonin oder Thymidin oder Total (= Gesamtfraktion)
t	Zeit
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAT	Twin arginine translocation
TBS	Tris buffered saline
t _d	Verdoppelungszeit

TEMED	N,N,N'-Tetramethylethyldiamin
TEV	Tobacco etch virus
TIM	Translocase of the inner mitochondrial membrane
TM	Transmembran
TOM	Translocase of the outer mitochondrial membrane
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit = $\mu\text{mol}/\text{min}$
V	Valin
v	volume
VCP	variety of cellular processes (=p97)
W	Tryptophan
w	weight
Y	Tyrosin
Yme1	Yeast Mitochondrial Escape
YP	Bacto-yeast extract
ZIS	Zusätzliche Importsequenz

6. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der letzten Jahre mit Rat und Tat unterstützt haben:

Zuvorderst gilt mein Dank Prof. Dr. Dr. Walter Neupert für die Bereitstellung dieses spannenden Themas und für die gute Betreuung.

Besonders danke ich den Mitgliedern meines „*Thesis Advisory Committee*“ Prof. Dr. Soll, Prof. Dr. Hartl, Prof. Dr. Hauska und Prof. Dr. Boßerhoff. Ihre Ideen und Anregungen haben das Projekt sehr bereichert.

Ein besonders herzliches Dankeschön möchte ich an Dr. Nikola Wagener richten. Ihre Anregungen, Ideen und die stete Unterstützung und Bereitschaft zur Diskussion haben entscheidend zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen. Ich wünsche ihr und ihrer Familie alles Gute für die Zukunft.

In gleicher Weise möchte ich mich bei meinen „Laborkollegen“ Sandra Esser und Heike Bauerschmitt für die Unterstützung und freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken.

Im Laufe der letzten Jahre ist mir viel Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft von den Mitarbeitern und Kollegen entgegengebracht worden. Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle insbesondere bei Karin Waegemann, Petra Robisch, Christiane Kotthoff und Gabi Ludwig.

Mein Dank gilt nicht zuletzt Christine Werner und Karin Hauck, die mir durch Ihre großartige Arbeit und Unterstützung vieles erleichtert haben.

Außerdem möchte ich Frau Reisenauer, Frau Köber und Frau Haslbeck danken.

Mein Dank gilt insbesondere auch meinen Eltern und Großeltern, für ihre uneingeschränkte Unterstützung und Anteilnahme zu jeder Zeit.

7. Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum/ -ort	26. Januar 1983 in Regensburg
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch

AUSBILDUNG

Aug 2008 – Jul 2012	Dissertation im Fach Biologie Universität Ludwig-Maximilians-Universität, München Stipendien Kekulé (Verband der chemischen Industrie), IMPRS-Stipendium (Max-Planck-Gesellschaft)
Aug 2007 – Jun 2008	Aufbaustudium Neurobiologie (GPA: 4) Universität Pennsylvania State University, Hershey (USA) Stipendien ERP (Studienstiftung des deutschen Volkes), Fellowship Stipend (Hershey Medical Center)
Okt 2002 – Apr 2007	Diplomstudium Biochemie (Note: 1,1) Universität Universität Regensburg, Regensburg Stipendien Max Weber Programm (Elitenetzwerk Bayern), Bayerische Begabtenförderung
Jun 2001	Vorgezogenes Abitur (Note 1,0) nach Überspringen einer Jahrgangsstufe (Von-Müller-Gymnasium, Regensburg)

Journalartikel

Ackermann, M., et al., *The vertebrate homolog of sulfide-quinone reductase is expressed in mitochondria of neuronal tissues*. **Neuroscience**, 2011. 199: p. 1-12.

Wagener, N., **Ackermann, M.**, et al., *A Pathway of Protein Translocation in Mitochondria Mediated by the AAA-ATPase Bcs1*. **Mol Cell**, 2011. 44(2): p. 191-202

Gastredner

Falling Walls Lab 2012 (Wien), *Breaking the wall of hidden brain activities*, Jun 2012, Gastgeber: Fallings Walls Foundation in Zusammenarbeit mit ATKearney

Universitätsmedizin Göttingen (Göttingen), *Mitochondrial encephalopathies*, Mai 2012, Gastgeber: Prof. G. Trendelenburg

Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (Berlin), *An unexpected concept of protein translocation: Bcs1 and topogenesis of Rip1*, Mai 2012, Gastgeber: Prof. F. Rathjen

Parmenides Foundation (Pullach), *Are Dendritic Spines the Neural Substrate of Cognitive Breathing (CB)?*, Okt 2010, Gastgeber: Dr. A. Ploghaus

Charité Berlin (Berlin), *BCS1L – a critical factor for neural development and integrity?*, Aug 2009, Gastgeber: Dr. A.-L. Piña

Posterpräsentationen

New Frontiers in (Bio)Chemistry - From Nanopatterning to Toxicity (Verband der chemischen Industrie), *The role of Bcs1 in biogenesis of Rip1*, Feb 2010

interact (www.munich-interact.org), *Biogenesis of the Rieske iron-sulfur protein (Rip1) of the mitochondria*, Mär 2010

8. Literaturverzeichnis

- Ahnert P, Picha KM, Patel SS (2000) A ring-opening mechanism for DNA binding in the central channel of the T7 helicase-primase protein. *EMBO J* 19:3418-3427.
- Armstrong JS, Yang H, Duan W, Whiteman M (2004) Cytochrome bc(1) regulates the mitochondrial permeability transition by two distinct pathways. *J Biol Chem* 279:50420-50428.
- Attardi G, Schatz G (1988) Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol* 4:289-333.
- Babst M, Wendland B, Estepa EJ, Emr SD (1998) The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J* 17:2982-2993.
- Barnett JP, Robinson C, Scanlan DJ, Blindauer CA (2011) The Tat protein export pathway and its role in cyanobacterial metalloprotein biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett* 325:1-9.
- Berks BC (1996) A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol Microbiol* 22:393-404.
- Bieniossek C, Niederhauser B, Baumann UM (2009) The crystal structure of apo-FtsH reveals domain movements necessary for substrate unfolding and translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:21579-21584.
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523.
- Bochtler M, Hartmann C, Song HK, Bourenkov GP, Bartunik HD, Huber R (2000) The structures of HslU and the ATP-dependent protease HslU-HslV. *Nature* 403:800-805.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Brandt U, Uribe S, Schagger H, Trumpower BL (1994) Isolation and characterization of QCR10, the nuclear gene encoding the 8.5-kDa subunit 10 of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome bc1 complex. *J Biol Chem* 269:12947-12953.
- Brandt U, Yu L, Yu CA, Trumpower BL (1993) The mitochondrial targeting presequence of the Rieske iron-sulfur protein is processed in a single step after insertion into the cytochrome bc1 complex in mammals and retained as a subunit in the complex. *J Biol Chem* 268:8387-8390.
- Brasseur G, Bruscella P, Bonnefoy V, Lemesle-Meunier D (2002) The bc(1) complex of the iron-grown acidophilic chemolithotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* functions in the reverse but not in the forward direction. Is there a second bc(1) complex? *Biochim Biophys Acta* 1555:37-43.
- Brasseur G, Levican G, Bonnefoy V, Holmes D, Jedlicki E, Lemesle-Meunier D (2004) Apparent redundancy of electron transfer pathways via bc(1) complexes and terminal oxidases in the extremophilic chemolithoautotrophic *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biochim Biophys Acta* 1656:114-126.
- Buchanan G, Sargent F, Berks BC, Palmer T (2001) A genetic screen for suppressors of *Escherichia coli* Tat signal peptide mutations establishes a critical role for the second arginine within the twin-arginine motif. *Arch Microbiol* 177:107-112.
- Burton RE, Siddiqui SM, Kim YI, Baker TA, Sauer RT (2001) Effects of protein stability and structure on substrate processing by the ClpXP unfolding and degradation machine. *EMBO J* 20:3092-3100.
- Chi A, Huttenhower C, Geer LY, Coon JJ, Syka JE, Bai DL, Shabanowitz J, Burke DJ, Troyanskaya OG, Hunt DF (2007) Analysis of phosphorylation sites on proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:2193-2198.

- Cline K, Ettinger WF, Theg SM (1992) Protein-specific energy requirements for protein transport across or into thylakoid membranes. Two luminal proteins are transported in the absence of ATP. *J Biol Chem* 267:2688-2696.
- Connor JR, Menzies SL (1996) Relationship of iron to oligodendrocytes and myelination. *Glia* 17:83-93.
- Crivellone MD, Wu MA, Tzagoloff A (1988) Assembly of the mitochondrial membrane system. Analysis of structural mutants of the yeast coenzyme QH₂-cytochrome c reductase complex. *J Biol Chem* 263:14323-14333.
- Cruciat CM, Hell K, Fölsch H, Neupert W, Stuart RA (1999) Bcs1p, an AAA-family member, is a chaperone for the assembly of the cytochrome bc(1) complex. *Embo J* 18:5226-5233.
- Dalal K, Duong F (2011) The SecY complex: conducting the orchestra of protein translocation. *Trends Cell Biol* 21:506-514.
- Dalal K, Nguyen N, Alami M, Tan J, Moraes TF, Lee WC, Maurus R, Sligar SS, Brayer GD, Duong F (2009) Structure, binding, and activity of Syd, a SecY-interacting protein. *J Biol Chem* 284:7897-7902.
- Dalal S, Rosser MF, Cyr DM, Hanson PI (2004) Distinct roles for the AAA ATPases NSF and p97 in the secretory pathway. *Mol Biol Cell* 15:637-648.
- Davidson E, Ohnishi T, Tokito M, Daldal F (1992) Rhodobacter capsulatus mutants lacking the Rieske FeS protein form a stable cytochrome bc₁ subcomplex with an intact quinone reduction site. *Biochemistry* 31:3351-3358.
- Davies JM, Brunger AT, Weis WI (2008) Improved structures of full-length p97, an AAA ATPase: implications for mechanisms of nucleotide-dependent conformational change. *Structure* 16:715-726.
- de Lonlay P, Valnot I, Barrientos A, Gorbatyuk M, Tzagoloff A, Taanman JW, Benayoun E, Chretien D, Kadhon N, Lombes A, de Baulny HO, Niaudet P, Munnich A, Rustin P, Rotig A (2001) A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure. *Nat Genet* 29:57-60.
- DeLaBarre B, Brunger AT (2005) Nucleotide dependent motion and mechanism of action of p97/VCP. *J Mol Biol* 347:437-452.
- DeLisa MP, Samuelson P, Palmer T, Georgiou G (2002) Genetic analysis of the twin arginine translocator secretion pathway in bacteria. *J Biol Chem* 277:29825-29831.
- Dilks K, Rose RW, Hartmann E, Pohlschroder M (2003) Prokaryotic utilization of the twin-arginine translocation pathway: a genomic survey. *J Bacteriol* 185:1478-1483.
- Elbehti A, Bresseur G, Lemesle-Meunier D (2000) First evidence for existence of an uphill electron transfer through the bc(1) and NADH-Q oxidoreductase complexes of the acidophilic obligate chemolithotrophic ferrous ion-oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J Bacteriol* 182:3602-3606.
- Elbehti A, Nitschke W, Tron P, Michel C, Lemesle-Meunier D (1999) Redox components of cytochrome bc-type enzymes in acidophilic prokaryotes. I. Characterization of the cytochrome bc₁-type complex of the acidophilic ferrous ion-oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J Biol Chem* 274:16760-16765.
- Fernandez-Vizarra E, Bugiani M, Goffrini P, Carrara F, Farina L, Procopio E, Donati A, Uziel G, Ferrero I, Zeviani M (2007) Impaired complex III assembly associated with BCS1L gene mutations in isolated mitochondrial encephalopathy. *Hum Mol Genet* 16:1241-1252.
- Fölsch H, Guiard B, Neupert W, Stuart RA (1996) Internal targeting signal of the BCS1 protein: a novel mechanism of import into mitochondria. *Embo J* 15:479-487.
- Frazier AE, Taylor RD, Mick DU, Warscheid B, Stoepel N, Meyer HE, Ryan MT, Guiard B, Rehling P (2006) Mdm38 interacts with ribosomes and is a component of the mitochondrial protein export machinery. *J Cell Biol* 172:553-564.
- Frickey T, Lupas AN (2004) Phylogenetic analysis of AAA proteins. *J Struct Biol* 146:2-10.
- Fu W, Japa S, Beattie DS (1990) Import of the iron-sulfur protein of the cytochrome b.c₁ complex into yeast mitochondria. *J Biol Chem* 265:16541-16547.

- Funes S, Kauff F, van der Sluis EO, Ott M, Herrmann JM (2011) Evolution of YidC/Oxa1/Alb3 insertases: three independent gene duplications followed by functional specialization in bacteria, mitochondria and chloroplasts. *Biol Chem* 392:13-19.
- Glick BS, Brandt A, Cunningham K, Muller S, Hallberg RL, Schatz G (1992) Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell* 69:809-822.
- Glynn SE, Martin A, Nager AR, Baker TA, Sauer RT (2009) Structures of asymmetric ClpX hexamers reveal nucleotide-dependent motions in a AAA+ protein-unfolding machine. *Cell* 139:744-756.
- Gohlke U, Pullan L, McDevitt CA, Porcelli I, de Leeuw E, Palmer T, Saibil HR, Berks BC (2005) The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:10482-10486.
- Golik P, Bonnefoy N, Szczepanek T, Saint-Georges Y, Lazowska J (2003) The Rieske FeS protein encoded and synthesized within mitochondria complements a deficiency in the nuclear gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8844-8849.
- Gray MW, Lang BF, Burger G (2004) Mitochondria of protists. *Annu Rev Genet* 38:477-524.
- Grivell LA (1989) Nucleo-mitochondrial interactions in yeast mitochondrial biogenesis. *Eur J Biochem* 182:477-493.
- Guo F, Maurizi MR, Esser L, Xia D (2002) Crystal structure of ClpA, an Hsp100 chaperone and regulator of ClpAP protease. *J Biol Chem* 277:46743-46752.
- Gutensohn M, Fan E, Frielingsdorf S, Hanner P, Hou B, Hust B, Klosgen RB (2006) Toc, Tic, Tat et al.: structure and function of protein transport machineries in chloroplasts. *J Plant Physiol* 163:333-347.
- Hanson PI, Whiteheart SW (2005) AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:519-529.
- Hartl FU, Schmidt B, Wachter E, Weiss H, Neupert W (1986) Transport into mitochondria and intramitochondrial sorting of the Fe/S protein of ubiquinol-cytochrome c reductase. *Cell* 47:939-951.
- Herrmann JM, Riemer J (2012) Mitochondrial disulfide relay: redox-regulated protein import into the intermembrane space. *J Biol Chem* 287:4426-4433.
- Hinnerwisch J, Fenton WA, Furtak KJ, Farr GW, Horwich AL (2005) Loops in the central channel of ClpA chaperone mediate protein binding, unfolding, and translocation. *Cell* 121:1029-1041.
- Hinson JT, Fantin VR, Schonberger J, Breivik N, Siem G, McDonough B, Sharma P, Keogh I, Godinho R, Santos F, Esparza A, Nicolau Y, Selvaag E, Cohen BH, Hoppel CL, Tranebjaerg L, Eavey RD, Seidman JG, Seidman CE (2007) Missense mutations in the BCS1L gene as a cause of the Bjornstad syndrome. *N Engl J Med* 356:809-819.
- Hoskins JR, Sharma S, Sathyanarayana BK, Wickner S (2001) Clp ATPases and their role in protein unfolding and degradation. *Adv Protein Chem* 59:413-429.
- Hoskins JR, Yanagihara K, Mizuuchi K, Wickner S (2002) ClpAP and ClpXP degrade proteins with tags located in the interior of the primary sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11037-11042.
- Hu J, Dong L, Outten CE (2008) The redox environment in the mitochondrial intermembrane space is maintained separately from the cytosol and matrix. *J Biol Chem* 283:29126-29134.
- Hunte C, Koepke J, Lange C, Rossmannith T, Michel H (2000) Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc(1) complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure* 8:669-684.
- Jarosch E, Geiss-Friedlander R, Meusser B, Walter J, Sommer T (2002) Protein dislocation from the endoplasmic reticulum--pulling out the suspect. *Traffic* 3:530-536.
- Joshi SA, Baker TA, Sauer RT (2003) C-terminal domain mutations in ClpX uncouple substrate binding from an engagement step required for unfolding. *Mol Microbiol* 48:67-76.
- Kispal G, Csere P, Prohl C, Lill R (1999) The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J* 18:3981-3989.

- Klosgen RB, Brock IW, Herrmann RG, Robinson C (1992) Proton gradient-driven import of the 16 kDa oxygen-evolving complex protein as the full precursor protein by isolated thylakoids. *Plant Mol Biol* 18:1031-1034.
- Kotarsky H, Tabasum I, Mannisto S, Heikinheimo M, Hansson S, Fellman V (2007) BCS1L is expressed in critical regions for neural development during ontogenesis in mice. *Gene Expr Patterns* 7:266-273.
- Landsberg MJ, Vajjhala PR, Rothnagel R, Munn AL, Hankamer B (2009) Three-dimensional structure of AAA ATPase Vps4: advancing structural insights into the mechanisms of endosomal sorting and enveloped virus budding. *Structure* 17:427-437.
- Lebrun E, Santini JM, Brugna M, Ducluzeau AL, Ouchane S, Schoepp-Cothenet B, Baymann F, Nitschke W (2006) The Rieske protein: a case study on the pitfalls of multiple sequence alignments and phylogenetic reconstruction. *Mol Biol Evol* 23:1180-1191.
- Lee S, Augustin S, Tatsuta T, Gerdes F, Langer T, Tsai FT (2011) Electron cryomicroscopy structure of a membrane-anchored mitochondrial AAA protease. *J Biol Chem* 286:4404-4411.
- Lenzen CU, Steinmann D, Whiteheart SW, Weis WI (1998) Crystal structure of the hexamerization domain of N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein. *Cell* 94:525-536.
- Leonhard K, Stiegler A, Neupert W, Langer T (1999) Chaperone-like activity of the AAA domain of the yeast Yme1 AAA protease. *Nature* 398:348-351.
- Lill R, Mühlenhoff U (2006) Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:457-486.
- Martin A, Baker TA, Sauer RT (2008) Pore loops of the AAA+ ClpX machine grip substrates to drive translocation and unfolding. *Nat Struct Mol Biol* 15:1147-1151.
- Matos CF, Robinson C, Di Cola A (2008) The Tat system proofreads FeS protein substrates and directly initiates the disposal of rejected molecules. *EMBO J* 27:2055-2063.
- Matsuo E, Mori H, Shimoike T, Ito K (1998) Syd, a SecY-interacting protein, excludes SecA from the SecYE complex with an altered SecY24 subunit. *J Biol Chem* 273:18835-18840.
- Mendel S, McCarthy A, Barnett JP, Eijlander RT, Nenninger A, Kuipers OP, Robinson C (2008) The Escherichia coli TatABC system and a Bacillus subtilis TatAC-type system recognise three distinct targeting determinants in twin-arginine signal peptides. *J Mol Biol* 375:661-672.
- Mick DU, Wagner K, van der Laan M, Frazier AE, Perschil I, Pawlas M, Meyer HE, Warscheid B, Rehling P (2007) Shy1 couples Cox1 translational regulation to cytochrome c oxidase assembly. *Embo J* 26:4347-4358.
- Mineri R, Pavelka N, Fernandez-Vizarra E, Ricciardi-Castagnoli P, Zeviani M, Tiranti V (2009) How do human cells react to the absence of mitochondrial DNA? *PLoS One* 4:e5713.
- Miyata T, Yamada K, Iwasaki H, Shinagawa H, Morikawa K, Mayanagi K (2000) Two different oligomeric states of the RuvB branch migration motor protein as revealed by electron microscopy. *J Struct Biol* 131:83-89.
- Mogk A, Haslberger T, Tessarz P, Bukau B (2008) Common and specific mechanisms of AAA+ proteins involved in protein quality control. *Biochem Soc Trans* 36:120-125.
- Mokranjac D, Sighting M, Popov-Celeketich D, Berg A, Hell K, Neupert W (2005) The import motor of the yeast mitochondrial TIM23 preprotein translocase contains two different J proteins, Tim14 and Mdj2. *J Biol Chem* 280:31608-31614.
- Molik S, Karnauchov I, Weidlich C, Herrmann RG, Klosgen RB (2001) The Rieske Fe/S protein of the cytochrome b6/f complex in chloroplasts: missing link in the evolution of protein transport pathways in chloroplasts? *J Biol Chem* 276:42761-42766.
- Mori T, Ishitani R, Tsukazaki T, Nureki O, Sugita Y (2010) Molecular mechanisms underlying the early stage of protein translocation through the Sec translocon. *Biochemistry* 49:945-950.
- Mould RM, Robinson C (1991) A proton gradient is required for the transport of two luminal oxygen-evolving proteins across the thylakoid membrane. *J Biol Chem* 266:12189-12193.
- Mühlenhoff U, Richter N, Pines O, Pierik AJ, Lill R (2011) Specialized function of yeast Isa1 and Isa2 proteins in the maturation of mitochondrial [4Fe-4S] proteins. *J Biol Chem* 286:41205-41216.

- Muller M, Klosgen RB (2005) The Tat pathway in bacteria and chloroplasts (review). *Mol Membr Biol* 22:113-121.
- Musser SM, Theg SM (2000) Characterization of the early steps of OE17 precursor transport by the thylakoid DeltapH/Tat machinery. *Eur J Biochem* 267:2588-2598.
- Nett JH, Trumpower BL (1999) Intermediate length Rieske iron-sulfur protein is present and functionally active in the cytochrome bc1 complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274:9253-9257.
- Nobrega FG, Nobrega MP, Tzagoloff A (1992) BCS1, a novel gene required for the expression of functional Rieske iron-sulfur protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 11:3821-3829.
- Nouet C, Truan G, Mathieu L, Dujardin G (2009) Functional analysis of yeast bcs1 mutants highlights the role of Bcs1p-specific amino acids in the AAA domain. *J Mol Biol* 388:252-261.
- Ogura T, Whiteheart SW, Wilkinson AJ (2004) Conserved arginine residues implicated in ATP hydrolysis, nucleotide-sensing, and inter-subunit interactions in AAA and AAA+ ATPases. *J Struct Biol* 146:106-112.
- Ogura T, Wilkinson AJ (2001) AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells* 6:575-597.
- Palmer T, Sargent F, Berks BC (2005) Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway. *Trends Microbiol* 13:175-180.
- Panahandeh S, Maurer C, Moser M, DeLisa MP, Muller M (2008) Following the path of a twin-arginine precursor along the TatABC translocase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 283:33267-33275.
- Papish AL, Ladner CL, Turner RJ (2003) The twin-arginine leader-binding protein, DmsD, interacts with the TatB and TatC subunits of the *Escherichia coli* twin-arginine translocase. *J Biol Chem* 278:32501-32506.
- Pfanner N, Neupert W (1990) The mitochondrial protein import apparatus. *Annu Rev Biochem* 59:331-353.
- Rabinovich E, Kerem A, Frohlich KU, Diamant N, Bar-Nun S (2002) AAA-ATPase p97/Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol Cell Biol* 22:626-634.
- Ramos-Arroyo MA, Hualde J, Ayechu A, De Meirleir L, Seneca S, Nadal N, Briones P (2009) Clinical and biochemical spectrum of mitochondrial complex III deficiency caused by mutations in the BCS1L gene. *Clin Genet* 75:585-587.
- Rieske JS, Hansen RE, Zaugg WS (1964) STUDIES ON THE ELECTRON TRANSFER SYSTEM. 58. PROPERTIES OF A NEW OXIDATION-REDUCTION COMPONENT OF THE RESPIRATORY CHAIN AS STUDIED BY ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY. *J Biol Chem* 239:3017-3022.
- Robinson C, Bolhuis A (2004) Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 1694:135-147.
- Robinson C, Matos CF, Beck D, Ren C, Lawrence J, Vasisht N, Mendel S (2011) Transport and proofreading of proteins by the twin-arginine translocation (Tat) system in bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1808:876-884.
- Rothstein RJ (1983) One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol* 101:202-211.
- Rouiller I, Butel VM, Latterich M, Milligan RA, Wilson-Kubalek EM (2000) A major conformational change in p97 AAA ATPase upon ATP binding. *Mol Cell* 6:1485-1490.
- Sauer RT, Bolon DN, Burton BM, Burton RE, Flynn JM, Grant RA, Hersch GL, Joshi SA, Kenniston JA, Levchenko I, Neher SB, Oakes ES, Siddiqui SM, Wah DA, Baker TA (2004) Sculpting the proteome with AAA(+) proteases and disassembly machines. *Cell* 119:9-18.
- Schaerlaekens K, Schierova M, Lammertyn E, Geukens N, Anne J, Van Mellaert L (2001) Twin-arginine translocation pathway in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* 183:6727-6732.
- Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmuller L, Lautwein A, Schmitz F, Wittinghofer A (1997) The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 277:333-338.

- Schmidt CL, Shaw L (2001) A comprehensive phylogenetic analysis of Rieske and Rieske-type iron-sulfur proteins. *J Bioenerg Biomembr* 33:9-26.
- Schneider D, Schmidt CL (2005) Multiple Rieske proteins in prokaryotes: where and why? *Biochim Biophys Acta* 1710:1-12.
- Schütz M, Brugna M, Lebrun E, Baymann F, Huber R, Stetter KO, Hauska G, Toci R, Lemesle-Meunier D, Tron P, Schmidt C, Nitschke W (2000) Early evolution of cytochrome bc complexes. *J Mol Biol* 300:663-675.
- Siddiqui SM, Sauer RT, Baker TA (2004) Role of the processing pore of the ClpX AAA+ ATPase in the recognition and engagement of specific protein substrates. *Genes Dev* 18:369-374.
- Smith PM, Fox JL, Winge DR (2012) Biogenesis of the cytochrome bc(1) complex and role of assembly factors. *Biochim Biophys Acta* 1817:276-286.
- Sousa MC, Trame CB, Tsuruta H, Wilbanks SM, Reddy VS, McKay DB (2000) Crystal and solution structures of an HslUV protease-chaperone complex. *Cell* 103:633-643.
- Stan T, Brix J, Schneider-Mergener J, Pfanner N, Neupert W, Rapaport D (2003) Mitochondrial protein import: recognition of internal import signals of BCS1 by the TOM complex. *Mol Cell Biol* 23:2239-2250.
- Tamai S, Iida H, Yokota S, Sayano T, Kiguchiya S, Ishihara N, Hayashi J, Mihara K, Oka T (2008) Characterization of the mitochondrial protein LETM1, which maintains the mitochondrial tubular shapes and interacts with the AAA-ATPase BCS1L. *J Cell Sci* 121:2588-2600.
- Tatsuta T, Langer T (2009) AAA proteases in mitochondria: diverse functions of membrane-bound proteolytic machines. *Res Microbiol* 160:711-717.
- Todorich B, Pasquini JM, Garcia CI, Paez PM, Connor JR (2009) Oligodendrocytes and myelination: the role of iron. *Glia* 57:467-478.
- Van Doren SR, Yun CH, Crofts AR, Gennis RB (1993) Assembly of the Rieske iron-sulfur subunit of the cytochrome bc₁ complex in the *Escherichia coli* and *Rhodobacter sphaeroides* membranes independent of the cytochrome b and c₁ subunits. *Biochemistry* 32:628-636.
- Visapää I, Fellman V, Vesa J, Dasvarma A, Hutton JL, Kumar V, Payne GS, Makarow M, Van Coster R, Taylor RW, Turnbull DM, Suomalainen A, Peltonen L (2002) GRACILE syndrome, a lethal metabolic disorder with iron overload, is caused by a point mutation in BCS1L. *Am J Hum Genet* 71:863-876.
- von Heijne G (1985) Signal sequences. The limits of variation. *J Mol Biol* 184:99-105.
- Wagener N, Ackermann M, Funes S, Neupert W (2011) A pathway of protein translocation in mitochondria mediated by the AAA-ATPase Bcs1. *Mol Cell* 44:191-202.
- Wang J, Song JJ, Franklin MC, Kamtekar S, Im YJ, Rho SH, Seong IS, Lee CS, Chung CH, Eom SH (2001) Crystal structures of the HslVU peptidase-ATPase complex reveal an ATP-dependent proteolysis mechanism. *Structure* 9:177-184.
- Wang P, Dalbey RE (2011) Inserting membrane proteins: the YidC/Oxa1/Alb3 machinery in bacteria, mitochondria, and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 1808:866-875.
- Wang Q, Song C, Irizarry L, Dai R, Zhang X, Li CC (2005) Multifunctional roles of the conserved Arg residues in the second region of homology of p97/valosin-containing protein. *J Biol Chem* 280:40515-40523.
- Weibezahn J, Schlieker C, Bukau B, Mogk A (2003) Characterization of a trap mutant of the AAA+ chaperone ClpB. *J Biol Chem* 278:32608-32617.
- Weiner JH, Bilous PT, Shaw GM, Lubitz SP, Frost L, Thomas GH, Cole JA, Turner RJ (1998) A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins. *Cell* 93:93-101.
- Wendler P, Shorter J, Plisson C, Cashikar AG, Lindquist S, Saibil HR (2007) Atypical AAA+ subunit packing creates an expanded cavity for disaggregation by the protein-remodeling factor Hsp104. *Cell* 131:1366-1377.
- Wendler P, Shorter J, Snead D, Plisson C, Clare DK, Lindquist S, Saibil HR (2009) Motor mechanism for protein threading through Hsp104. *Mol Cell* 34:81-92.

- White SR, Lauring B (2007) AAA+ ATPases: achieving diversity of function with conserved machinery. *Traffic* 8:1657-1667.
- Wittig I, Braun HP, Schagger H (2006) Blue native PAGE. *Nat Protoc* 1:418-428.
- Ye Y, Meyer HH, Rapoport TA (2001) The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* 414:652-656.
- Yen MR, Tseng YH, Nguyen EH, Wu LF, Saier MH, Jr. (2002) Sequence and phylogenetic analyses of the twin-arginine targeting (Tat) protein export system. *Arch Microbiol* 177:441-450.
- Yu CA, Xia JZ, Kachurin AM, Yu L, Xia D, Kim H, Deisenhofer J (1996) Crystallization and preliminary structure of beef heart mitochondrial cytochrome-bc1 complex. *Biochim Biophys Acta* 1275:47-53.
- Yu RC, Hanson PI, Jahn R, Brunger AT (1998) Structure of the ATP-dependent oligomerization domain of N-ethylmaleimide sensitive factor complexed with ATP. *Nat Struct Biol* 5:803-811.
- Zara V, Conte L, Trumpower BL (2007) Identification and characterization of cytochrome bc(1) subcomplexes in mitochondria from yeast with single and double deletions of genes encoding cytochrome bc(1) subunits. *Febs J* 274:4526-4539.
- Zara V, Conte L, Trumpower BL (2009) Biogenesis of the yeast cytochrome bc1 complex. *Biochim Biophys Acta* 1793:89-96.
- Zhang X, Shaw A, Bates PA, Newman RH, Gowen B, Orlova E, Gorman MA, Kondo H, Dokurno P, Lally J, Leonard G, Meyer H, van Heel M, Freemont PS (2000) Structure of the AAA ATPase p97. *Mol Cell* 6:1473-1484.